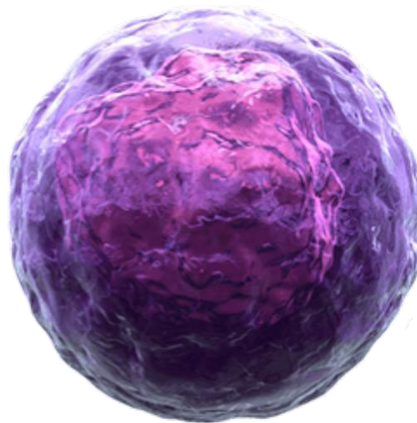




**Sara Isabel Monteiro e
Sousa Fernandes**

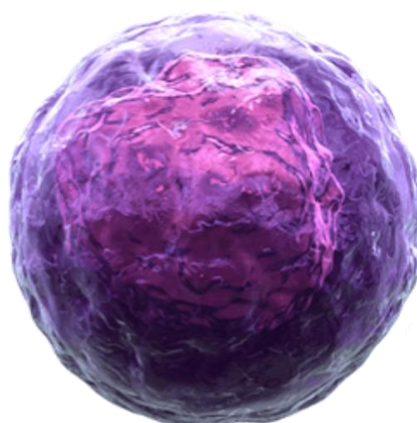
**Avaliação do papel dos polimorfismos em enzimas
metabolizadoras e enzimas transportadoras de
fármacos em neoplasias hematológicas**





**Sara Isabel Monteiro e
Sousa Fernandes**

**Avaliação do papel dos polimorfismos em enzimas
metabolizadoras e enzimas transportadoras de
fármacos em neoplasias hematológicas**



DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Sara Isabel Monteiro e
Sousa Fernandes**

**Avaliação do papel dos polimorfismos em enzimas
metabolizadoras e enzimas transportadoras de
fármacos em neoplasias hematológicas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Bela Sarmento Antunes da Cruz Ribeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e da Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

“Recomeça...
Se puderes,
Sem angústia e sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro,
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses.
De nenhum fruto queiras só metade.

E, nunca saciado,
Vai colhendo
Ilusões sucessivas no pomar
E vendo
Acordado,
O logro da aventura.
És homem, não te esqueças!
Só é tua a loucura
Onde, com lucidez, te reconheças.”
– **Miguel Torga**

“*May the odds be ever in your favour.*”
– **Suzanne Collins**

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Helena Abreu Silva

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Bela Sarmento Antunes da Cruz Ribeiro

professora auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Maria Joana Lima Barbosa de Melo

professora auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

agradecimentos

A realização deste trabalho não se teria tornado uma realidade sem o apoio e incentivo de várias pessoas, às quais estarei eternamente grata.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, pela orientação desta dissertação e pelo apoio prestado, pelos conselhos, pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade ao longo de todo o trabalho, pela amizade e pela confiança, e ainda pela oportunidade de poder participar em eventos científicos que tanto contribuem para a minha formação. À Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira pelo apoio e disponibilidade ao longo de todo o mestrado.

À Mestre Ana Cristina Gonçalves por todo o apoio, pela disponibilidade e dedicação, pela amizade, pela partilha de conhecimentos, pela ajuda incansável na parte experimental do projeto, pela motivação e pela paciência que teve comigo.

Ao Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra e do Hospital da Figueira da Foz, por facultarem generosamente todas as amostras de doentes e informações necessárias.

À Mestre Raquel Alves, pela ajuda incessante, pelos conselhos e pelos incentivos, pela partilha de conhecimentos e pelo pragmatismo que tantas vezes ajudou a avançar no trabalho. Em especial, um obrigada enorme pela amizade e pela alegria.

Às minhas colegas do Laboratório 1.07, das Lindas, à Cátia e à Mariana, mas em especial à Joana, pela ajuda incrível e por tudo o que me ensinou, pelos conselhos e pela disponibilidade sem fim, pela alegria, pela motivação e pelo apoio incondicionais; à Ana pela disponibilidade total e por se ter desdobrado em quantas fosse preciso para me ajudar e pela motivação constante; e à Sara, a minha twin, por toda a ajuda, por ter sido a maior companheira desta etapa, pelas conversas em Sarês e por todas as brincadeiras e parvoíces. Às três, agradeço especialmente a amizade, porque companhias assim não se arranjam facilmente, e foi graças a esta alegria que o trabalho se tornou mais leve e mais divertido. Um obrigada gigante pelo apoio, por todos os bocadinhos de distração e pelas gargalhadas. Sem vocês, claramente, isto não era possível.

Ao Monteiro, que tem sido um amigo e pêras, por todo o carinho e apoio neste que há-de ser sempre o trabalho dos 'leucopitos'. Esta amizade prova que a música une as pessoas de uma maneira mesmo bonita. À Marta, por todo o carinho e por toda a amizade, estejamos onde estivermos. À Kika, pelo carinho, pela inspiração e pela amizade. À família Geão que sempre foi uma segunda casa para mim, pelo carinho enorme e pelo apoio gigante que sempre me deram.

Ao Estúdio 34 e ao F Show que me permitem apaixonar-me e libertar-me cada vez mais na música.

Às meninas do 2º esquerdo do prédio azul, Vânia, Teresinha, Gi e Megui e, especialmente, à minha Fernandinha, com quem as conversas são tão fáceis e sem barreiras.

Ao Pedro, à Maria e ao Gui, os meus afilhados, por todo o carinho e apoio, em tudo, e por todas as palermices à mistura. Ao Gonçalo Vaz Pedro por ser um companheiro de luta, pela amizade e pelo caminho e, especialmente, pela alegria inesgotável.

Ao João Manuel, ao grupo de GVX do 10º ano e a todos os que fazem parte da pastoral e dos Campinácios do CAIC, por me ajudarem a manter os pés assentes na terra. Ao António Sant'Ana por ser um amigo e uma inspiração exemplares.

À Joana Matos, a minha irmã de coração. Pelas conversas noite fora, pelo carinho, pela confiança, pelo abraço e pelo porto seguro que és. Deus tem surpresas mesmo boas. Assim, hão-de sempre haver dias melhores para vir, bichinho.

Ao Luís, a melhor surpresa de todos os dias, contigo cada dia é sempre uma nova aventura. Por todo o amor, pelo carinho, pela dedicação e pela entrega, pela simplicidade com que tornaste este caminho tão mais fácil. Por seres uma companhia incrível e por não me deixares desistir de nada, por acreditares incondicionalmente em mim, mesmo quando perco o ânimo. Por seres um exemplo de empenho e de força de vontade, um exemplo de pessoa, um Obrigada enorme. 'No dia em que não der tudo, no dia seguinte dou o dobro.'

À minha família incrível,

Ao meu irmão, à Dilana e à minha pequenina River, por serem mais um bocadinho de casa pelo mundo e por, mesmo longe, se fazerem sempre presentes.

À Shila, que durante 15 anos foi a bolinha de pelo mais carinhosa e mais mimosa do mundo.

Aos meus Avós, por terem sido os maiores exemplos de força de vontade e de carinho, por me terem dado uma infância cheia de amor e de experiências maravilhosas e por serem responsáveis por uma grande parte do que sou hoje. Um Obrigada especial à minha Avó, que é uma inspiração inacreditável para mim, por tudo. Ao Zé Rui por todo o carinho e por todo o empenho. À minha prima Catarina pelo carinho e pela ajuda científica. Ao resto da família por isto mesmo, por ser família. Obrigada.

Aos meus Pais. Por tudo, de sempre e para sempre. Por serem a melhor família do mundo, pelo apoio sem medida, por terem feito das tripas coração para que eu pudesse chegar até aqui, por não me deixarem cair, pelo amor incondicional e pela alegria com que vivemos. Por serem exemplos de força, coragem e perseverança. Vocês são fora de série, Obrigada. Anoro-vos!

palavras-chave

Polimorfismo; Proteína transportadora; Proteína metabolizadora; Neoplasia Hematológica; Desenvolvimento neoplásico; Sobrevivência

resumo

O cancro é um dos maiores causadores globais de mortalidade e morbidade, ocorrendo cerca de 14 milhões de novos casos por ano e 8,2 milhões de mortes anuais com esta patologia, números que tendem a aumentar 70% nas próximas duas décadas.

A característica tumoral mais nefasta é a sua capacidade de metastização para outros órgãos, um mecanismo que pode ser despoletado pela falha dos mecanismos normais de controlo de crescimento, proliferação e reparação celulares, que facilita o processo de transformação de células normais em células cancerígenas.

A oncogénese processa-se em três etapas, a iniciação, a promoção e a progressão e pode ter origem em células estaminais cancerígenas, que regulam as capacidades de propagação e recidiva do tumor.

As neoplasias hematológicas resultam de alterações genéticas e /ou epigenéticas que conduzem à desregulação da proliferação, ao bloqueio da diferenciação e/ou à resistência à apoptose.

Para além dos fatores de risco exógenos, como agentes carcinogénicos físicos, químicos e biológicos, existem também fatores endógenos, incluindo características genéticas, que podem alterar a predisposição para o aparecimento de neoplasias, bem como influenciar a resposta à terapêutica.

Uma das terapêuticas aplicadas no tratamento do cancro é a quimioterapia. Os fármacos administrados a doentes oncológicos seguem normalmente o percurso de absorção, distribuição, metabolização e eliminação. Este curso pode sofrer alterações caso as proteínas transportadoras e metabolizadoras necessárias não atuem corretamente.

Para um melhor conhecimento da influência das alterações provocadas por variações nos genes que codificam proteínas transportadoras de efluxo (MDR1, MRP1), proteínas de influxo (OCTN2) e proteínas metabolizadoras (UCK2), o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação de polimorfismos nos genes *MDR1*, *MRP1*, *OCTN2* e *UCK2* e da sua relação com a predisposição para o desenvolvimento de neoplasias hematológicas.

Para isto, foram utilizadas amostras de 307 doentes com neoplasias hematológicas, 83 de Síndrome Mielodisplásica (SMD), 63 Leucemia Mieloide Aguda (LMA), 16 de Síndrome Mielodisplásica/Neoplasias Mieloproliferativas (SMD/NMP), 77 de Mieloma Múltiplo (MM) e 68 de Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS) e 164 de controlos não neoplásicos e/ou indivíduos saudáveis. As amostras de ADN foram extraídas do sangue periférico com protocolo adequado.

De forma a determinar os genótipos correspondentes a cada amostra, realizaram-se técnicas de RFLP-PCR e ARMS-PCR. Posteriormente, calcularam-se estatisticamente as frequências alélicas e genotípicas relativas às variantes polimórficas dos genes *MDR1*, *MRP1*, *OCTN2* e *UCK2* e

verificou-se se estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

De seguida, avaliou-se a força de associação entre as formas polimórficas e o risco de desenvolvimento de neoplasias hematológicas, através do cálculo do risco relativo por análise de regressão logística. Avaliaram-se ainda os perfis genéticos e a possível relação com o desenvolvimento e progressão da neoplasia com recurso a regressão logística e análise de Kaplan-Meier.

De um modo geral as frequências alélicas e genotípicas não se revelaram alteradas comparativamente ao esperado.

A análise do odds ratio associado ao polimorfismo rs1045642 do gene *MDR1* revelou que o genótipo CT pode constituir um fator de risco aumentado de 1,84x para o desenvolvimento de Gamapatias Monoclonais e 2,27x para o desenvolvimento de Mieloma Múltiplo. Por outro lado, a presença de genótipos portadores do alelo T têm um efeito protetor no desenvolvimento de MM (OR=0,41). O cálculo do risco associado ao polimorfismo rs4148330 do gene *MRP1* revela que o genótipo AG é um fator protetor (OR=0,50) para o desenvolvimento de LMA, assim como o alelo G (OR=0,50). Além disso, verificámos que existe uma associação de risco de desenvolver neoplasia com o polimorfismo rs2185268 do gene *UCK2*. De facto, a presença dos genótipos CC e AC representam um fator de risco 4,59x aumentado para o desenvolvimento de SMD/NMP. O polimorfismo rs274561 do gene *OCTN2* não apresenta relação com o risco relativo de desenvolvimento neoplásico.

Da avaliação da influência dos polimorfismos em estudo na sobrevivência global dos doentes, podemos assumir que a presença do genótipo GG relativo ao polimorfismo rs2185268 do gene *UCK2* representa uma diminuição da sobrevivência em 11 meses.

Os resultados obtidos a partir do nosso estudo permitem-nos concluir que os polimorfismos podem ser fatores relevantes na predisposição para o desenvolvimento de neoplasias hematológicas e na progressão destas doenças.

keywords

Polymorfism; Drug transporter; Metabolizing protein; Hematological Neoplasias; Neoplastic development; Survival

abstract

Cancer is one of the major causes of mortality and morbidity, with an incidence of 14 million new cases per year and 8.2 million deaths associated. These numbers must have an increasement of 70% in the next two decades.

The capacity of cancers to metastasize to other organs is the most nocive characteristic of tumors. Metastasis can be caused by failure of normal growing, proliferation and reparation mechanisms of the cell, facilitating the process of transformation of normal cells into cancer cells.

Oncogenesis is a three step process, initiation, promotion and progression, and can be originated by cancer stem cells, that regulate propagation and relapse features of the tumor.

Hematological neoplasias result from genetic and/or epigenetic alterations that lead to deregulation of cells proliferation, to differentiation blocking and/or to resistance to apoptosis.

Besides exogenous risk factors, such as physical, chemical and biological agents, endogenous factors, as genetics characteristics, can also modulate the predisposition for the development of neoplasias.

Chemotherapy is one of the therapeutic approaches in the treatment of cancer. The course followed by the administered drugs is divided in absorption, distribution, metabolization and elimination, and can be modified if the transporter and metabolizing proteins do not act correctly.

For a better knowledge of the influence of variations in genes coding efflux transporter proteins (*MDR1*, *MRP1*), influx transporter proteins (*OCTN2*) and metabolizing proteins (*UCK2*), we analyzed the association between polymorphisms in *MDR1*, *MRP1*, *OCTN2* and *UCK2* genes and predisposition for the development of hematological neoplasias.

We used 83 Myelodysplastic Syndrome (MDS), 63 Acute Myeloid Leukemia (AML), 16 Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasias (MDS/MPN), 77 Multiple Myeloma (MM) and 68 Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) patients' samples and 164 non-neoplastic and/or healthy individuals' samples. DNA samples were extracted from peripheral blood by an adequate protocol.

To determine the genotypes, the samples were assessed by RFLP-PCR and ARMS-PCR techniques. Allelic and genetic frequencies of *MDR1*, *MRP1*, *OCTN2* and *UCK2* genes were statistically calculated and Hardy-Weinberg equilibrium was measured.

Posteriorly, we evaluated the strength of association between polymorphic variants and the development of hematological neoplasias by calculating the associated odds ratio, through logistic regression analysis. We also evaluated the relation between genetic profiles and the development and progression of neoplasias by logistic regression and Kaplan-Meier analysis.

Generally, allelic and genotypic frequencies did not deviate from the expected values.

The analysis of odds ratio relating polymorphism rs1045642 from gene *MDR1* and disease development revealed that CT genotype is a risk factor for the development of Monoclonal Gammopathies, with an odds ratio of 1,84x, and for the development of Multiple Myeloma, with an odds ratio of 2,27x. Individuals with genotypes TT or CT have a decreased predisposition for the development of MM (OR=0.41). The calculus of odds ratio associated to polymorphism rs414833 from *MRP1* gene showed that AG genotype has a protector effect for the development of AML (OR=0.50), as well as allele G (OR=0,50). The odds ratio associated to rs2185268 polymorphism from gene *UCK2* revealed that individuals with CC or AC genotypes have an increased predisposition (OR=4.59) for the development of MDS/MPN. Polymorphism rs274561 from gene *OCTN2* showed no relevant associations with neoplasias' development.

The study of overall survival related to polymorphisms revealed that the presence of GG genotype from *UCK2* gene represents a decrease of 11 months in patients' survival rates.

The results of this study allow us to accomplish that polymorphisms play relevant roles in the predisposition for the development and progression of hematological neoplasias.

Índice

Júri.....	v
Agradecimentos.....	vii
Resumo, palavras-chave.....	xi
Abstract, keywords.....	xv
Índice de figuras.....	xxv
Índice de tabelas.....	xxvii
Lista de símbolos.....	xxix
1 – Introdução.....	1
1.1 – Cancro.....	3
1.2 – Sistema Hematopoiético.....	6
1.3 – Neoplasias Hematológicas.....	7
1.3.1 – Síndrome Mielodisplásica.....	8
1.3.2 – Leucemia Mieloide Aguda.....	9
1.3.3 – Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa.....	10
1.3.4 – Mieloma Múltiplo.....	11
1.3.5 – Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado.....	12
1.4 – Variabilidade Genética.....	13
1.5 – Proteínas transportadoras e metabolizadoras.....	16
1.5.1 – <i>Carnitine/Organic Cation Transporter 2 (OCTN2)</i>	18
1.5.2 – <i>Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1)</i>	19
1.5.3 – <i>Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1)</i>	20
1.5.4 – <i>Uridine-Cytidine Kinase 2 (UCK2)</i>	21
2 – Objetivos.....	23
3 – Materiais e Métodos.....	27

3.1 – Selecção e caracterização dos doentes e controlos.....	29
3.2 – Extracção e quantificação do ADN genómico.....	29
3.3 – Análise dos polimorfismos dos genes <i>MDR1</i> (rs1045642), <i>MRP1</i> (rs4148330), <i>UCK2</i> (rs2185268) e <i>OCTN2</i> (rs274561) e sequenciação de linhas celulares	31
3.3.1 – Análise dos polimorfismos dos genes <i>MDR1</i> (rs1045642) e <i>MRP1</i> (rs4148330) por RFLP-PCR (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction</i>).....	31
3.3.2 – Análise dos polimorfismos dos genes <i>UCK2</i> (rs2185268) e <i>OCTN2</i> (rs274561) por ARMS-PCR (<i>Amplification-Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction</i>).....	33
3.4 – Análise estatística.....	33
4 – Resultados.....	35
4.1 – Caracterização dos doentes hematológicos e dos controlos não neoplásicos.....	37
4.2 – Sequenciação das linhas celulares K562, F36-P, CEM e HEL.....	38
4.3 – Caracterização genotípica das variantes polimórficas dos genes <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> , <i>UCK2</i> e <i>OCTN2</i> em doentes neoplásicos e em controlos não neoplásicos.....	39
4.4 – Distribuições alélica e genotípica das variantes polimórficas dos genes <i>MDR1</i> (rs1045642), <i>MRP1</i> (rs4148330), <i>UCK2</i> (rs2185268) e <i>OCTN2</i> (rs274561).....	41
4.4.1 – Análise das frequências alélicas.....	41
4.4.2 – Análise das frequências genotípicas.....	43
4.4.3 – Análise do risco relativo associado aos genótipos individuais dos genes <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> , <i>UCK2</i> e <i>OCTN2</i>	45
4.4.4 – Análise do risco relativo associado aos perfis genéticos <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> , <i>UCK2</i> e <i>OCTN2</i>	51
4.5 – Avaliação da influência dos polimorfismos nos genes <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> , <i>UCK2</i> e <i>OCTN2</i> na sobrevivência global dos doentes oncológicos.....	54

5 – Discussão.....	55
5.1 – <i>Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1)</i>	59
5.2 – <i>Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1)</i>	61
5.3 – <i>Uridine-Cytidine Kinase 2 (UCK2)</i>	64
5.4 – <i>Carnitine/Organic Cation Transporter 2 (OCTN2)</i>	65
5.5 – Risco associado aos perfis genéticos.....	66
5.6 – Análise da influência dos polimorfismos na sobrevivência global.....	67
5 – Conclusão.....	69
6 – Referências bibliográficas.....	75

Lista de figuras

Figura 1	Célula estaminal cancerígena, carcinogénese, tumorigénese e resistência tumoral.....	5
Figura 2	Esquema representativo da Hematopoiese.....	7
Figura 3	Gráfico representativo da complexidade mutacional em Síndrome Mielodisplásica.....	9
Figura 4	Consequências das mutações pontuais.....	15
Figura 5	Transportadores ABC.....	17
Figura 6	Distribuição dos doentes de acordo com a patologia.....	38
Figura 7	Imagens representativas dos fragmentos dos genes <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> , <i>OCTN2</i> e <i>UCK2</i> em gel de electroforese (agarose a 4%).....	40
Figura 8	Gráfico representativo da influência das variantes polimórficas do gene <i>UCK2</i> na sobrevivência global de doentes com Mieloma Múltiplo.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1	Sequências dos primers utilizados.....	32
Tabela 2	Condições das reações de RFLP-PCR e ARMS-PCR	32
Tabela 3	Genotipagem dos SNP rs2185268 (UCK2) e rs274561 (OCTN2) K562, F36-P, CEM e HEL por sequenciação.	38
Tabela 4	Frequências alélicas das variantes polimórficas dos genes <i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> , <i>OCTN2</i> e <i>UCK2</i>	42
Tabela 5	Frequências genotípicas e odds ratio relativos às Neoplasias Hematológicas, Neoplasias Mieloides e Gamapatias Monoclonais.....	46
Tabela 6	Frequências genotípicas e odds ratio relativos às Neoplasias Mieloides (Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa).....	48
Tabela 7	Frequências genotípicas e odds ratio relativos às Gamapatias Monoclonais (Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado e Mieloma Múltiplo).....	50
Tabela 8	Risco relativo associado aos perfis genéticos em Neoplasias Hematológicas (Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa, Mieloma Múltiplo, Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado).....	52

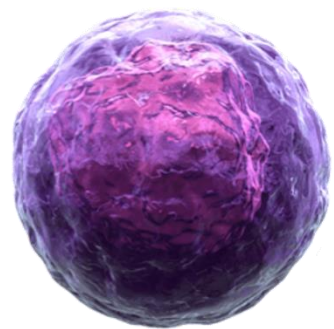
Lista de símbolos

A	Adenina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AREB-1	Anemia refratária com excesso de blastos-1
AREB-2	Anemia refratária com excesso de blastos-2
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
ARSA-T	Anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose
ATP	Adenosina trifosfato
BLC-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
C	Citosina
CEC	Célula estaminal cancerígena
CEM	Célula estaminal multipotente
CHE	Célula estaminal hematopoiética
CLP	Célula linfóide progenitora
CMP	Citidina mieloide progenitora
CPM	Célula progenitora multipotente
CRDM	Citopenia refratária com displasia multilinhagem
CRDU	Citopenia refratária com displasia unilinhagem

FGFR3	Recetor 3 dos Fatores de Crescimento do Fibroblasto
G	Guanina
GM	Gamapatias Monoclonais
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgH	Imunoglobulina
IgM	Imunoglobulina M
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
MDR1	<i>Multidrug Resistance Protein 1</i>
MGUS	Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
MRP1	<i>Multidrug Resistance-Related Protein 1</i>
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
LMMCJ	Leucemia Mielomonocítica Crónica Juvenil
LMCa	Leucemia Mieloide Crónica atípica
MM	Mieloma Múltiplo
NM	Neoplasias Mieloides
NK	<i>Natural Killer</i>
SLC	<i>Solute Carrier</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>

SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD-NC	Síndrome Mielodisplásica não classificada
SMD/NMP	Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa
OCTN2	<i>Organic cation/carnitine transporter</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAX-5	<i>Paired box protein Pax-5</i>
P-gp	Glicoproteína-P
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
T	Timina
UCK2	<i>Uridine-cytidine kinase 2</i>
UMP	Uridina Monofosfato
VNTRs	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>

1. Introdução



Avaliação do papel dos polimorfismos em enzimas metabolizadoras e enzimas transportadoras de fármacos
em neoplasias hematológicas

Imagem adaptada de <https://mmbitesizescience.files.wordpress.com/2013/07/4-hemo-stem.png>

1. Introdução

1.1. Cancro

O cancro é uma das maiores causas de mortalidade e de morbilidade, ocorrendo cerca de 14 milhões de novos casos por ano e 8,2 milhões de mortes anuais relacionadas com o cancro (Stewart and Wild, 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que estes números aumentem em 70% nos próximos vinte anos (“www.who.com,” 2015). O cancro é um termo genérico para caracterizar um grupo alargado de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo e, na Europa, trata-se da segunda maior causa de morte, ultrapassada apenas pelas doenças cardiovasculares (Siegel and Jemal, 2014).

Quando os mecanismos normais de controlo do crescimento, da diferenciação e da proliferação celulares falham, surgem células aberrantes que podem ter a capacidade de invadir tecidos contíguos e metastizar para outros órgãos, sendo esta a maior causa de morte provocada por tumor (Talmadge and Fidler, 2010). Todo este mecanismo é despoletado por apenas uma célula que, num processo multi-faseado, se transforma numa célula tumoral, evoluindo de um estado pré-cancerígeno para um tumor maligno. Estas alterações resultam da interação entre os fatores genéticos individuais e diversos agentes exógenos, incluindo carcinogénios físicos (radiações ultravioleta e ionizantes), químicos (amianto, arsénio, componentes do fumo de tabaco) e biológicos (bactérias, parasitas, infeções virais), e/ou endógenos (inflamação, alterações no sistema imunitário) (Alberts et al., 2008). O aumento da idade resulta numa ampliação da probabilidade da incidência de cancro, principalmente devido a uma acumulação de fatores de risco e a uma diminuição dos mecanismos de reparação celular (Finkel et al., 2007).

Os sistemas de reparação celulares, como a reparação do ADN ou a extrusão de substâncias prejudiciais à célula, são os responsáveis pela manutenção do funcionamento celular normal, regulando o equilíbrio entre fenómenos de proliferação e de morte celular. Quando ocorrem alterações nestes mecanismos, resultantes de mutações, translocações,

deleções e/ou amplificações, a homeostasia celular do organismo pode ser comprometida e podem daí resultar diversas patologias, incluindo cancro. Estas modificações genéticas acontecem maioritariamente nas células somáticas, não nas células germinativas, não sendo estas passadas hereditariamente, embora certas modificações hereditárias aumentem a probabilidade de ocorrência tumoral (Lodish and Berk, 2008).

A oncogénese é um processo em que podem ser consideradas três etapas, a iniciação, a promoção e a progressão. Numa fase inicial ocorrem alterações genéticas irreversíveis num único gene. A promoção envolve a proliferação desregulada dos clones anteriormente iniciados, aumentando assim a sua população, e a fase de progressão caracteriza-se pela acumulação de mais alterações genéticas nestes clones, conduzindo-os à aquisição de um fenótipo maligno e invasivo (Martinez et al., 2003).

Em 1994, foram identificadas células estaminais que se consideram responsáveis pela carcinogénese, pela manutenção tumoral, pela propagação e pela recidiva do tumor, as células estaminais cancerígenas (CEC). Resultado destas características, as CEC são foco de um grande interesse científico, nomeadamente para determinar o seu potencial como alvo terapêutico (Allegra et al., 2014) (Figura 1).

As terapêuticas convencionais para tratar o cancro incluem a cirurgia, a radioterapia e a terapia sistémica (quimioterapia, hormonoterapia e terapia-alvo dirigida). Todas estas estratégias terapêuticas visam reduzir a massa tumoral, tendo como objetivo final a remissão completa do cancro. Individualmente, estas modalidades serão suficientes em alguns casos mas pode ser necessário fazer uma combinação terapêutica, em casos em que se considere mais vantajoso (www.astrazeneca.com.br, 2014).

No caso da quimioterapia, um dos tratamentos incluídos na terapia sistémica, são administrados compostos químicos que, uma vez no organismo, seguirão uma lógica farmacocinética composta por três passos, absorção, distribuição e eliminação, sendo esta última dividida em metabolismo e excreção. Após a administração do fármaco, este é absorvido para a circulação sistémica e posteriormente distribuído reversivelmente para outros fluidos ou tecidos corporais, entrando nas células, na maior parte dos casos, com o auxílio de proteínas transportadoras existentes na membrana celular. Uma vez no alvo

terapêutico, o composto ativo do fármaco poderá necessitar de ativação metabólica, para que possa atuar corretamente (Rang *et al.*, 2012).

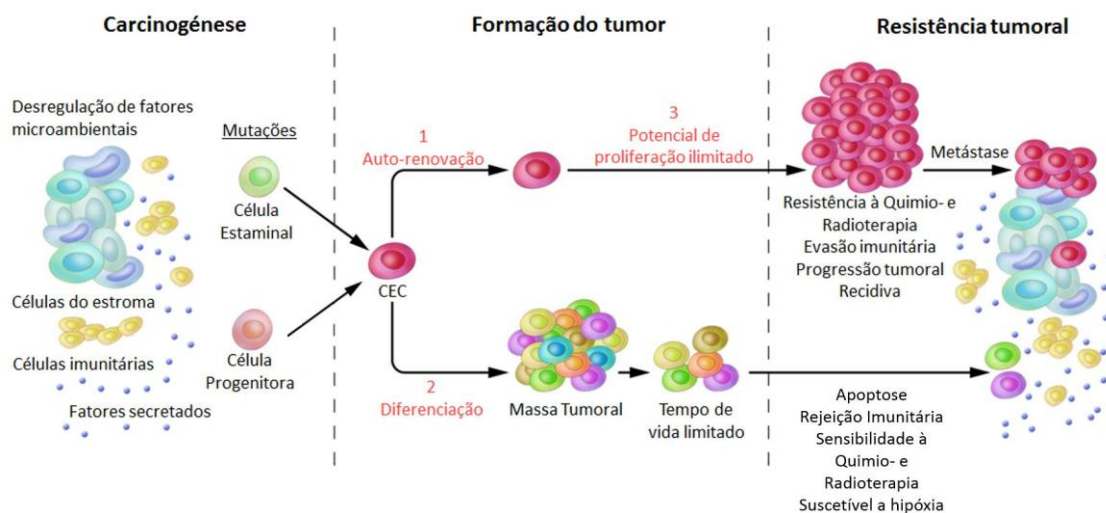


Figura 1 – Célula estaminal cancerígena, carcinogénese e resistência tumoral. (A) Os tumores podem surgir de células somáticas a partir de mutações genéticas de genes associados ao cancro. Adicionalmente, a desregulação de fatores do microambiente pode contribuir para o processo carcinogénico. Estes eventos podem afetar predominantemente células estaminais e/ou progenitoras com maior tempo de vida, que podem representar a célula cancerígena de origem (CEC). Foram identificados noutros modelos patológicos, como o cancro colorretal, tipos de células somáticas progenitoras ou totalmente diferenciadas como fontes de transformação maligna. **(B)** As CEC são capazes de induzir a tumorigénese a partir de três características: (1) capacidade de auto-renovação, (2) capacidade de se diferenciarem em populações tumorais desprovidas de características de CEC e (3) potencial ilimitado de proliferação e crescimento tumorigénico. Além disto, as CEC presentes em algumas patologias têm a capacidade de controlar as respostas angiogénicas tumorais e/ou induzir a génese vascular, ou seja, as vias potencialmente promotoras de crescimento tumoral. Adicionalmente, as características imunoevasivas das CEC podem contribuir para a génese do tumor e, em último caso, para a progressão tumoral. **(C)** As CEC podem exibir resistência aumentada a agentes quimioterapêuticos e/ou radiação ionizante. As CEC podem ter uma capacidade preferencial para se evadirem à resposta do sistema imunitário. Se as CEC representarem, de facto, a população de células resistentes em doentes oncológicos, irão também conduzir a progressão neoplásica, recidivas tumorais e metástases. Apesar de esta hipótese necessitar de validação, a progressão clínica do tumor foi já correlacionada com a frequência de CEC em doentes de melanoma. CEC, Célula estaminal cancerígena (Adaptado de Frank *et al.*, 2010).

1.2. Sistema Hematopoiético

O sangue é um dos tecidos com maior capacidade regenerativa, constituído por vários tipos celulares com diversas funções que têm uma origem comum, a célula estaminal hematopoiética (CEH), localizada na medula óssea. As CEH são células multipotentes e originam não só todos os tipos celulares sanguíneos diferenciados mas também outros tipos de células, como osteoclastos nos ossos (Alberts *et al.*, 2008). As CEH são ainda células com capacidade de auto-renovação, quiescência, dormência e capacidade de diferenciação em células especializadas do sangue, que participam na regulação da homeostase e na resposta imune (Chotinantakul and Leraanansaksiri, 2012).

A capacidade de auto-renovação destas células é a característica responsável pela continuidade da hematopoiese ao longo da vida do indivíduo e, para que haja uma manutenção do balanço necessário entre CEH multipotentes e células diferenciadas, a maioria das CEH encontra-se num nicho, com um microambiente especializado, no estado quiescente (Kanji *et al.*, 2011; Keller *et al.*, 1992).

À medida que as células se vão dividindo, originam-se células cada vez mais especializadas e comprometidas com a linhagem respetiva e, consequentemente, com menor potencial de auto-renovação. OS diferentes tipos celulares diferenciados que compõem o sangue são os eritrócitos, plaquetas, monócitos, macrófagos, granulócitos, mastócitos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e células dendríticas (Kasper *et al.*, 2015).

O desenrolar da diferenciação de CEH em células especializadas inicia-se com a divisão da CEH, dando origem a uma célula progenitora multipotente (CPM) e a uma nova CEH por auto-renovação. A CPM dá origem aos precursores das duas linhagens, a célula linfoide progenitora (CLP), de onde resultam as células da linhagem linfoide, e a célula mieloide progenitora (CMP), da qual vão resultar as células da linhagem mieloide. O desenvolvimento e a maturação destas células progenitoras em células da linhagem com que estão comprometidas dependem também dos estímulos presentes no microambiente medular, nomeadamente fatores de transcrição. Das CLP serão originados os linfócitos T, os linfócitos B e as células NK, e das CMP surgirão os granulócitos, os

monócitos/macrófagos, os eritrócitos e os megacariócitos. As células dendríticas podem derivar das CLP ou das CMP (Kanji *et al.*, 2011) (Figura 2).

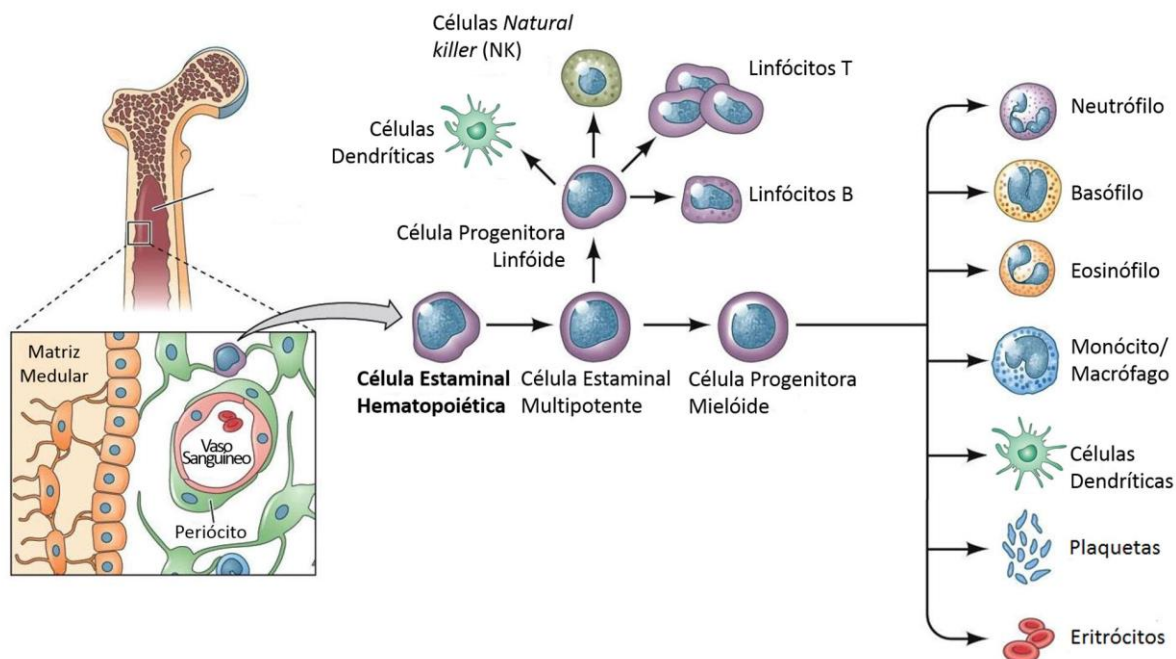


Figura 2 – Esquema representativo da Hematopoiese. A célula estaminal hematopoiética (CEH), presente na medula óssea através da sua capacidade de auto-renovação permite a manutenção da sua população, dando origem à célula estaminal multipotente (CEM) que, por diferenciação, origina as células precursoras das linhagens mielóide e linfóide (CMP e CLP, respetivamente). Estas diferenciam-se respetivamente nas células maduras mielóides e linfóides (Adaptado de Domen *et al.*, 2006).

1.3. Neoplasias Hematológicas

Ao longo dos anos, a componente genética tem-se revelado cada vez mais significativa na etiologia das doenças neoplásicas (Balmain *et al.*, 2003; Brockmøller, 2000; Hansen and Cavenee, 1987; Ling *et al.*, 2015), tendo-se tornado num dos maiores focos de investigação científica. Esta relação entre a genética e o cancro surge também em doenças neoplásicas hematológicas, como as Neoplasias Mielóides (NM), Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa (SMD/NMP), e nas Gamopatias Monoclonais (GM), nomeadamente no Mieloma Múltiplo (MM) e na Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS).

1.3.1. Síndrome Mielodisplásica

A Síndrome Mielodisplásica define-se como um grupo de doenças clonais da célula hematopoiética pluripotencial, molecularmente heterogénea, caracterizada clinicamente por citopenias no sangue periférico, hiperproliferação medular com hematopoiese ineficaz, displasia e elevado risco de progressão para leucemia aguda, mais frequentemente leucemia mieloide aguda (LMA) (Bennett *et al.*, 1982; Nimer, 2008; Tefferi and Vardiman, 2009).

O aumento da apoptose e a persistência da diferenciação das fases iniciais da doença são perdidos com a evolução para leucemia aguda. É uma doença dos idosos, com uma idade mediana de 71 anos ao diagnóstico, com sobrevivência associada muito variável. Esta condição patológica pode ser dividida em duas categorias principais, SMD primária ou de novo e SMD secundária (ou relacionada com a terapia) (Foran and Shammo, 2012).

A Organização Mundial de Saúde classifica a SMD considerando as citopenias, a percentagem de blastos no sangue e medula óssea, as características de displasia das células afetadas e a presença de sideroblastos em anel, dividindo-a em sete grupos. São eles citopenia refratária com displasia uni- ou multilinhagem (CRDU ou CRDM), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos-1 ou -2 (AREB-1 ou AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificada (SMD-NC) e SMD associada à deleção isolada do braço longo do cromossoma 5 (Síndrome 5q-) (Swerdlow *et al.*, 2008; Tefferi and Vardiman, 2009).

É reconhecida a relevância prognóstica de alterações epigenéticas e de mutações pontuais na redefinição da estratificação de risco destas doenças, reconhecendo-se mais de 40 genes mutados. Cerca de 90% dos doentes com SMD têm em média 2 a 3 mutações (Figura 3). As mutações definem-se por sub-grupos consoante a via funcional afetada: a metilação do ADN ou a modificação da cromatina, a maquinaria do spliceosoma, as proteínas RAS e outras vias sinalizadoras, fatores de transcrição, coesinas e vias de

reparação do ADN. De todas estas mutações, as que afetam o *splicing* e a desregulação epigenética (metilação e modificação da cromatina) são as mais comuns, realçando a importância crítica destas vias na patogénese da SMD. Cerca de 50% dos doentes têm uma mutação num componente da maquinaria do spliceossoma, o que revela que o *splicing* do pré-mARN é a via mais frequentemente alterada, parecendo ocorrer precocemente na evolução clonal (Haferlach *et al.*, 2014; Papaemmanuil *et al.*, 2013).

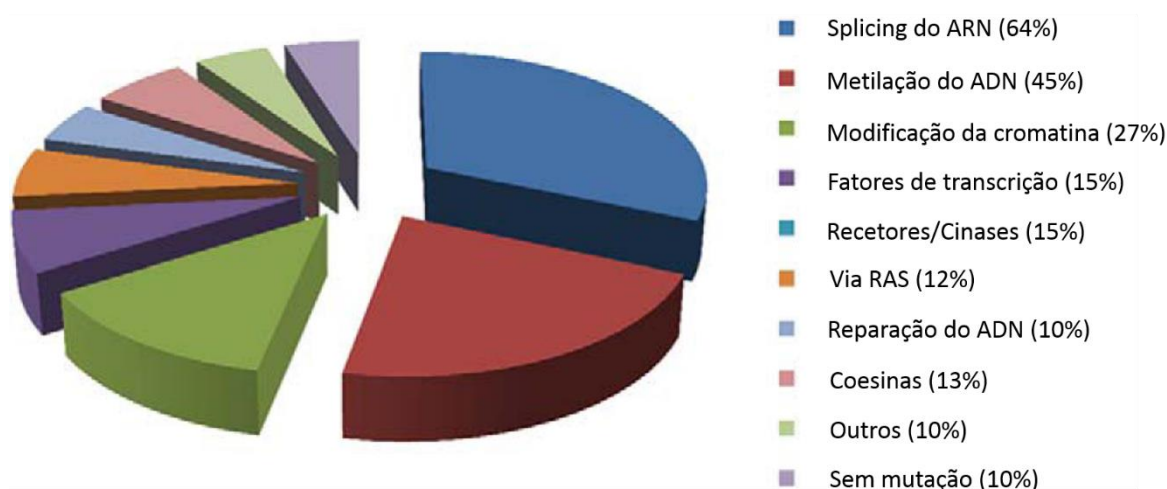


Figura 3 – Gráfico representativo da complexidade mutacional em Síndrome Mielodisplásica. As mutações foram organizadas em vias funcionais. Em aproximadamente 10% dos casos não foram identificadas mutações associadas à condição neoplásica. Mutações sobrepostas (co-ocorrência de duas ou mais mutações em doentes de SMD) não estão representadas neste gráfico, razão pela qual a soma das percentagens ultrapassa os 100% (Adaptado de Odenike *et al.*, 2015).

1.3.2. Leucemia Mieloide Aguda

A Leucemia Mieloide Aguda é um grupo de doenças da célula estaminal hematopoiética com heterogeneidade genética, caracterizada por diferenciação desregulada, proliferação clonal e acumulação de células mieloides imaturas (que representam mais de 20% das células nucleadas), os mieloblastos e progressão clínica agressiva. Este é o tipo de leucemia aguda mais comum em adultos, com uma idade média de diagnóstico de 67 anos. A doença tem um prognóstico em geral baixo, apresentando

uma média de sobrevivência aos 5 anos apenas de 10% nos doentes acima dos 60 anos. A LMA manifesta-se como uma síndrome de falência medular, representada por anemia, infeções por leucopenia com neutropenia e hemorragias por trombocitopenia (Siegel and Jemal, 2014).

A taxa de incidência desta doença aumenta com a idade, com a instabilidade cromossómica, como mutações no gene *AML-1* da linha germinal, e outras alterações congénitas, com o contacto com radiação ionizante e solventes orgânicos como benzeno ou outros produtos petrolíferos (Levine and Bloomfield, 1992; Sekeres and Keng, 2014).

A LMA secundária pode desenvolver-se em doentes com diferentes doenças hematológicas, tais como anemia aplástica ou neutropenia congénita severa. As Síndromes mielodisplásicas e mieloproliferativas com um mínimo de três meses podem também progredir para LMA, como mencionado (Szotkowski *et al.*, 2009).

Sendo uma doença biologicamente heterogénea, a OMS definiu em 2008 uma nova classificação para a LMA, tendo em conta a morfologia e as características genéticas e imunofenotípicas, dividindo-a em quatro categorias. As quatro categorias são LMA com anomalias genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, LMA secundária a terapêutica e LMA não especificada (Swerdlow *et al.*, 2008).

1.3.3. Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa

As síndromes mielodisplásicas/neoplasias mieloproliferativas são patologias clínicas e biologicamente heterogéneas e mal conhecidas, embora alguns dados sobre a fisiopatologia estejam a surgir, sobretudo através de análise genética e de estudos em modelos de ratinho. Foram já identificadas anomalias na regulação de vias mieloides de proliferação celular, maturação e sobrevivência, traduzidas na presença de citopenias, células displásicas com função anormal e infiltração leucémica em vários órgãos (Bain, 1999). A OMS define 4 entidades com características clínicas e patológicas algo distintas, a leucemia mielomonocítica crónica (LMMC, a síndrome mais comum do grupo), a leucemia

mielomonocítica crónica juvenil (LMMCJ, uma doença pediátrica agressiva), a leucemia mieloide crónica atípica (LMCa) e a anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose (ARSA-T, uma entidade provisória) (Swerdlow *et al.*, 2008). Existem casos raros de doentes que apresentam displasia celular e características mieloproliferativas mas não se enquadram em nenhuma destas síndromes específicas e são designados como tendo SMD/NMP não classificável.

Porque em geral estas patologias surgem nos idosos (exceto a LMMCJ) e o prognóstico é mau, mesmo com alotransplante medular, o tratamento é primariamente paliativo com medidas de suporte. Estes doentes raramente têm anomalias moleculares específicas que possam servir de alvo terapêutico com os medicamentos conhecidos à data.

1.3.4. Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma doença maligna monoclonal da célula plasmática cuja patogénese é parcialmente conhecida. De acordo com alguns mecanismos moleculares, o MM pode subdividir-se em 2 subtipos, um com rearranjos que envolvem o locus da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) e um subtipo hiperdiplóide, que engloba diversas trissomias. Estas anomalias cromossómicas são, apesar de necessárias, insuficientes para a transformação maligna, dado que foram também já identificadas em Gamopatias Monoclonais de Significado Indeterminado (MGUS), uma síndrome pré-maligna que regularmente precede o MM (Bolli *et al.*, 2014). Baseado no cariótipo, o MM é classificado como não-hiperdiplóide e hiperdiplóide, sendo que o grupo hiperdiplóide representa normalmente 50 a 60% dos casos e é caracterizado por trissomias dos cromossomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21. Por outro lado, as células não-hiperdiplóides de MM apresentam translocações entre as porções 14q32, o *locus* da IgH, e outros múltiplos genes envolvidos na oncogénese, como as ciclinas D1 e D3 ou o recetor 3 do fator de crescimento do fibroblastos (FGFR3) (Bianchi and Munshi, 2015).

Os eventos oncogénicos na patogénese do MM incluem ativações de oncogenes provocadas por mutações ou alterações na sua expressão e desequilíbrios entre os fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da célula B, como o BCL-2 (Pettersson et al., 1998). A sobre-expressão de proteínas BCL-2 têm sido relacionadas com a resistência à apoptose *in vitro* e com instabilidade genómica, e foi também considerada um fator de predição da ineficácia da terapêutica com interferão. A hiper-expressão do proto-oncogene *BCL-6*, de fatores de transcrição como o PAX-5 e mutações em genes onco-supressores têm sido descritos como essenciais na linfomagénesis de células B. Está também descrito um aumento da metilação dos genes supressores tumorais nas etapas iniciais de desenvolvimento de MM, sendo que esta aumenta à medida que a doença se desenvolve (Heuck et al., 2013; Jr et al., 2007).

1.3.5. Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado

A Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS) é uma das doenças pré-malignas mais comuns e afeta aproximadamente 3,5% da população numa média de idades de 50 anos (Dispenzieri et al., 2010; Eisele et al., 2012). A MGUS é caracterizada pela presença de menos de 10% de plasmócitos monoclonais na medula e pela produção de uma proteína monoclonal (IgG, IgA ou IgM) em quantidade inferior a 30g/dl, e pela inexistência de sintomas característicos de MM (hipercalcemia, insuficiência renal, anemia ou lesões da medula óssea) ou de outras patologias linfoproliferativas (Kyle et al., 2002). A doença pode recidivar totalmente em 2 a 5% dos casos, mas praticamente todos os casos de MM são precedidos de MGUS, havendo um risco relativo de progressão para MM ou outras neoplasias linfoproliferativas de cerca de 1% por ano. Particularmente, doentes com MGUS do subtipo IgG ou IgA progridem para MM e doentes com MGUS do subtipo IgM progridem para outras neoplasias linfoproliferativas, como macroglobulinemia de Waldenström (McMaster et al., 2009).

A MGUS está associada a fatores de risco como obesidade, exposição a pesticidas ou a radiação, bem como a história pessoal de doenças autoimunes, condições inflamatórias e infecções. Existe ainda uma predisposição genética para desenvolver MGUS (Kyle *et al.*, 2002; van de Donk *et al.*, 2014).

A importância da MGUS não se baseia apenas no risco aumentado para desenvolver neoplasias hematológicas, mas porque um clone reduzido pode também ser responsável pela produção de proteínas M tóxicas, com atividade de auto-anticorpo ou que se depositam nos tecidos. Estes doentes têm maior incidência de infecções, osteoporose e apresentam risco aumentado em 2 a 8 vezes para desenvolver neoplasias mieloides como SMD, LMA e policitemia vera, e ainda um risco 1,5 vezes maior para tumores não hematológicos (Gregersen *et al.*, 2000; Mailankody *et al.*, 2011; Roeker *et al.*, 2013).

1.4. Variabilidade genética

O aumento da complexidade de uns seres vivos, em relação a outros, estará fortemente relacionado com a selecção de formas mais sofisticadas de regulação da expressão génica e com a modificação de genes já existentes (Regateiro, 2003).

A diversidade humana é maioritariamente resultante de alterações no código genético. Apesar das regiões codificantes de genes representarem apenas 1,5% do genoma, a porção que tem efeito na função e na expressão génica será de 3% do genoma. Isto pode ser explicado pelo facto de muitas sequências de ADN em regiões não-codificantes apresentarem uma elevada conservação de identidade entre espécies, o que sugere que terão diversas funções como a regulação da estrutura da cromatina ou da expressão génica (Wright, 2005).

Os fatores que influenciam a variabilidade das taxas de mutação são ainda pouco conhecidos, embora se possam identificar taxas mais elevadas em determinadas sequências como os dinucleótidos CG, nas ilhas CpG (Fryxell and Moon, 2005). Genes que apresentam taxas de mutação elevadas contribuem desproporcionalmente para doenças

humanas (Chinnery *et al.*, 2002; Eyre-Walker and Eyre-Walker, 2014). Estas alterações no código genético influenciam significativamente as características individuais como a aparência física, a personalidade, as atitudes comportamentais ou a suscetibilidade para doenças (Voisey and Morris, 2008).

Os polimorfismos são variações que ocorrem na sequência do ADN com uma frequência mínima de 1%, com o objetivo principal de adaptação do organismo a diferentes condições envolventes e que são transmitidas através das gerações. Os principais tipos de polimorfismos no ADN são por exemplo os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), os VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) e os Indels (inserções ou deleções) (Devoret, 2004; Vignal *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2003; Wright, 2005).

OS SNP são a classe mais abundante de polimorfismos, com potencial de serem utilizados como biomarcadores moleculares na identificação de genes relacionados com doenças complexas, e como ferramentas auxiliares em estudos farmacogenómicos, como a resposta a fármacos. Estas são as principais razões pelas quais os polimorfismos são um foco de interesse científico (Sobrino *et al.*, 2005).

Como o próprio nome indica, os SNP definem-se como alterações de apenas uma base nucleotídica na sequência de ADN, tendo geralmente dois nucleótidos possíveis como alternativas para a mesma posição, ou seja, são bialélicos (Vignal *et al.*, 2002). O nível de gravidade das consequências destas alterações depende das modificações que provocam na capacidade funcional da proteína que codificam e do impacto da função ou funções afectadas no organismo, o que pode representar um efeito pleiotrópico.

As mutações podem ter efeitos deletérios, neutros ou benéficos. Quando os efeitos são benéficos, as mutações tendem a ser evolutivamente preservadas, por serem vantajosas para o portador, seja por maior adaptação ao meio ou em termos de capacidade reprodutiva (Charlesworth, 1990). Caso o portador não seja afectado, as mutações são consideradas neutras ou sinónimas. Neste caso, o codão resultante codifica o mesmo aminoácido que o codão original e, consequentemente, a proteína produzida será igual. No entanto, a quantidade produzida desta proteína pode estar alterada, caso a alteração de

codão leve a mudanças na maquinaria da tradução (Boer and Boer, 2001; Devoret, 2004). Apesar disto, as mutações sinónimas podem não ser silenciosas, se delas resultar um novo local de *splicing* ou se um já existente for suprimido, ou ainda caso haja uma transformação de uma sequência exónica em intrónica, ou vice-versa, resultando na produção de um polipéptido diferente (Figura 4) (Graur, 2008).

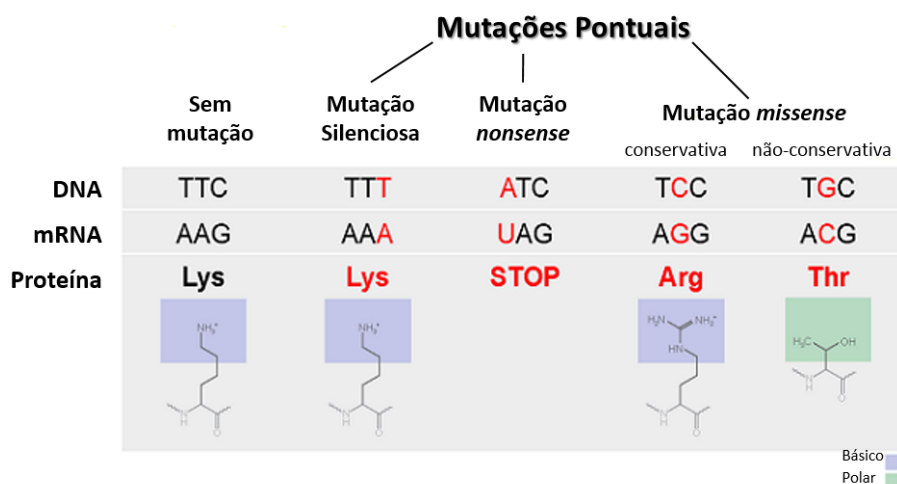


Figura 4 – Consequências das mutações pontuais (Adaptado de Metzler, n.d.).

Existem ainda as mutações não-sinónimas, ou modificadoras de aminoácidos, que podem ser classificadas como *missense* ou *nonsense*. As mutações *missense* transformam o codão afectado num outro que codifica um aminoácido diferente do codificado pelo codão anterior. As mutações *nonsense* alteram um codão com sentido para um codão terminador, provocando o fim da tradução e, consequentemente, originam a produção de uma proteína truncada. Por outro lado, as substituições que tornam codões stop em codões codificantes de aminoácidos resultam em proteínas maiores do que as originais (Graur, 2008).

Os polimorfismos podem surgir em qualquer parte do genoma, incluindo regiões promotoras, levando a variações na tradução e na expressão genética, (Kroeger et al., 1997) ou em genes que codifiquem proteínas transportadoras de influxo ou de efluxo, o

que pode traduzir-se em alterações na farmacocinética e na farmacodinâmica (leiri *et al.*, 2006; Nishizato *et al.*, 2003).

1.5. Proteínas transportadoras e metabolizadoras

Existem mecanismos na membrana celular especializados no transporte de substratos entre os meios intra- e extracelular que regulam a entrada e saída de moléculas como aminoácidos, açúcares ou neurotransmissores (Figura 5). Estas estruturas transportadoras dividem-se em moléculas da família de transportadores de soluto (SLC, do inglês *solute carrier*), responsáveis pelo transporte passivo de solutos, a favor do gradiente eletroquímico, de que é exemplo o OCTN2 (do inglês, *organic cation/carnitine transporter*), e em proteínas da superfamília de transportadores ABC (ABC, do inglês *ATP-binding cassette*), como a Glicoproteína (P-gp P) e a MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*), bombas de transporte que requerem ativação através da ligação a moléculas de ATP para que possa ocorrer transporte ativo dos substratos. Os substratos reconhecidos por estas moléculas são essencialmente endógenos, embora exista uma grande variedade de substâncias exógenas, designadas de xenobióticos, que também são reconhecidos e transportados por estes mecanismos, incluindo múltiplos fármacos (Sai and Tsuji, 2004).

O organismo está constantemente exposto a toxinas. De modo a reduzir os efeitos prejudiciais provocados por substâncias exógenas, o organismo desenvolveu mecanismos para os expelir. Ao nível celular, a membrana celular atua como barreira física na prevenção da entrada de xenobióticos nas células. Apesar dos mecanismos desenvolvidos, existem substâncias capazes de atravessar a membrana celular, entrando nas células dos organismos (Brinkmann and Eichelbaum, 2001; Fung and Gottesman, 2009).

A extrusão das substâncias potencialmente prejudiciais à célula e a limitação da sua entrada são dois dos mecanismos de proteção mais utilizados pelo organismo. Para que isto aconteça, existe uma distribuição generalizada de proteínas transportadoras nas membranas das células (Fung and Gottesman, 2009; Wang *et al.*, 2012).

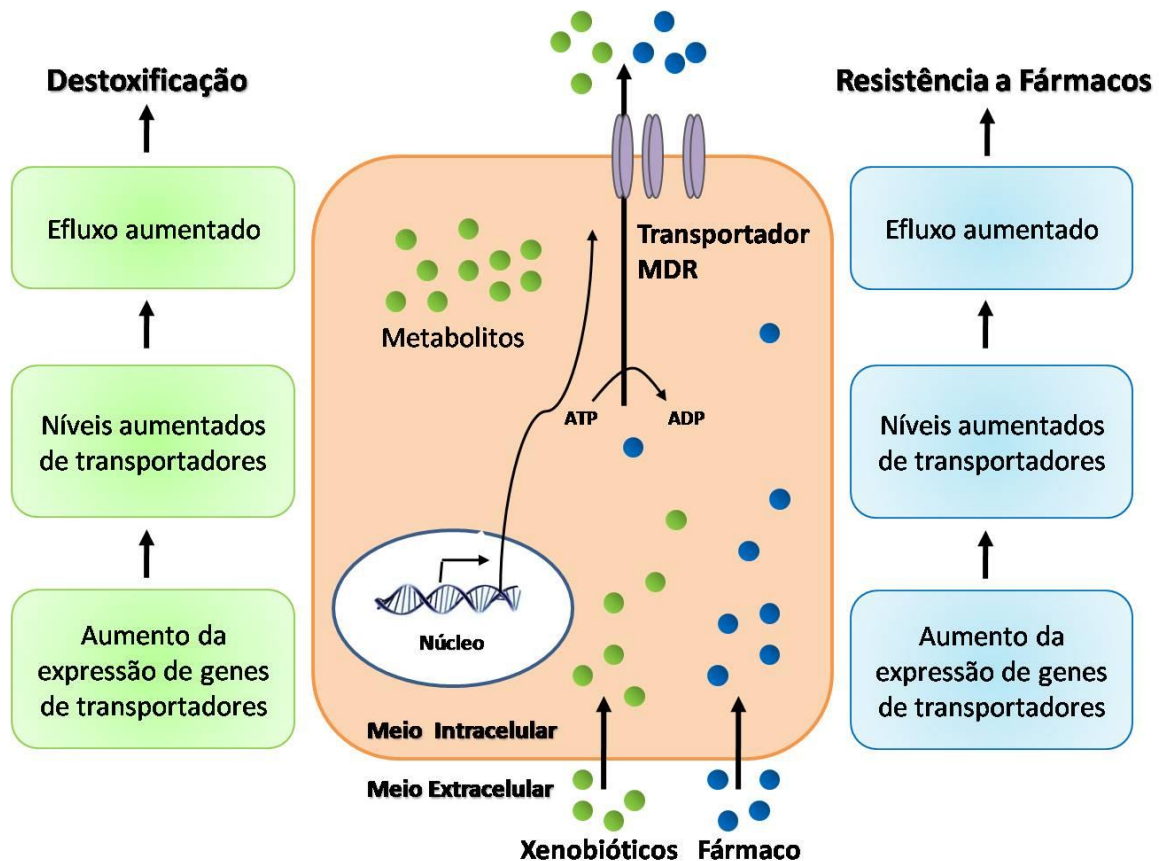


Figura 5 – Transportadores ABC. Esquema representativo do efluxo de xenobióticos e de fármacos. No caso do trajeto dos xenobióticos, o seu efluxo culmina na destoxificação celular e, no caso dos fármacos, o seu efluxo representa a evolução para resistência adquirida aos mesmos (Adaptado de Fletcher *et al.*, 2010).

As proteínas metabolizadoras são também parte do funcionamento fisiológico normal da célula e as suas funções estão relacionadas com mecanismos anti-virais e anti-cancerígenos (Miners and Birkett, 1998; Suzuki *et al.*, 2004).

Existem fármacos que necessitam de ser ativados para que possam atuar eficazmente. As proteínas metabolizadoras reconhecem uma grande variedade de xenobióticos utilizados no tratamento de neoplasias, ativando-os, e a perda de função destas proteínas pode estar relacionada com a aquisição de resistência a fármacos (Nebert and Russel, 2002; Sripayap *et al.*, 2013).

1.5.1. Carnitine/Organic Cation Transporter 2 (OCTN2)

Do grupo de transportadores membranares de influxo, SLC, faz parte a molécula OCTN2 (do inglês, *organic cation/carnitine transporter*), também denominada de SLC22A5, codificada pelo gene *OCTN2* e inicialmente identificada por Tamai *et al.* em 1998. A proteína OCTN2 é um transportador peculiar, dependente de iões de sódio (Na⁺), considerando as diferenças de pH, para o transporte de carnitina, e independente destes iões quando transporta xenobióticos. A carnitina é um composto presente nas mitocôndrias e que facilita o metabolismo dos ácidos gordos de cadeia longa, para a produção de energia (Kwok *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 1999; Tamai *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998).

As alterações no gene *SLC22A5* resultam em alterações no transporte de carnitina, podendo levar a uma deficiência primária de carnitina, uma condição patológica em que o metabolismo de ácidos gordos está comprometido. Nesta patologia, o decréscimo do transporte de carnitina traduz-se numa diminuição da oxidação de ácidos gordos, que leva à utilização sem regeneração de glucose como fonte de energia, resultando em hipoglicemia. Adicionalmente, ocorre uma perda de carnitina através da urina e uma acumulação de tecido adiposo em diversos órgãos, como o fígado ou o coração, podendo originar esteatose hepática ou miopatia (Longo *et al.*, 2006).

A proteína OCTN2 está também relacionada com o transporte de xenobióticos para o interior das células, razão pela qual poderá estar relacionada com alterações na concentração de fármaco intracelular, caso haja modificações genéticas associadas ao gene *OCTN2* (Angelini *et al.*, 2013). Um exemplo é o polimorfismo rs274561 em que há a substituição do nucleótido C pelo nucleótido A na posição 5q31.1-32 da cadeia de ADN (Shoji *et al.*, 1998), tendo este uma frequência (MAF, do inglês *Minor Allele Frequency*) de 37,6%. Esta alteração ocorre numa região intrónica, na zona promotora do gene *OCTN2*, o que poderá influenciar a expressão proteica e, a par disto, condicionar a terapêutica utilizada no tratamento do cancro.

1.5.2. *Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1)*

Da superfamília de transportadores de efluxo ABC faz parte a já muito estudada glicoproteína-P (P-gp, em que P significa “permeabilidade”), codificada pelo gene MDR1 (multidrug resistance 1), e identificada pela primeira vez em 1976 (Juliano and Ling, 1976). Estão presentes em maior concentração em órgãos excretores (Thiebaut et al., 1987) e são importantes na absorção, distribuição e eliminação de múltiplos fármacos. A P-gp reconhece alcaloides de vinca e antraciclinas como substratos e tem afinidade para muitos outros compostos, alguns xenotóxicos, incluindo diversos fármacos utilizados em quimioterapia (Sparreboom *et al.*, 1997; Ueda et al., 1987).

A excreção de substâncias potencialmente prejudiciais do meio intracelular é um mecanismo de proteção do organismo essencialmente desempenhado pela proteína transportadora MDR1. Esta ação pode ser observada nas membranas das células da superfície apical do trato gastrointestinal e em hepatócitos, confirmando assim as funções de excreção de xenobióticos e de metabolitos endógenos para a urina e para a biliar (Brinkmann and Eichelbaum, 2001).

Alterações genéticas no gene *MDR1* poderão alterar a expressão e a regulação desta proteína, alterando a excreção das substâncias adversas ao organismo. Mais especificamente, o polimorfismo rs1045642 na posição 7q21.12, exon 26, em que há a substituição do nucleótido C por um T (C3435T), mesmo sendo um polimorfismo sinónimo e redutor da expressão de MDR1, está descrito como potenciador da função desta proteína, possivelmente resultando num aumento de efluxo dos seus substratos nas células (Cavaco *et al.*, 2003; Gervasini *et al.*, 2006). Na população europeia, o alelo T apresenta uma frequência de 54,5%. Em situação de cancro, esta modificação poderá contribuir para o desenvolvimento de resistência a vários fármacos e interferir efetivamente na possibilidade de cura destes tumores com quimioterapia (Ambudkar *et al.*, 1999).

1.5.3. Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1)

A MRP1 (do inglês, *Multidrug Resistance-Related Protein 1*) é outra das proteínas mais importantes da família de transportadores ABC e é estruturalmente semelhante à MDR1, diferindo numa região transmembranar terminal adicional (Gottesman *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2011). Também conhecida como ABCC1, foi inicialmente identificada em 1992 como parte importante na resistência celular induzida em tumores (Cole *et al.*, 1992), reconhecendo um leque alargado de substratos, incluindo substâncias produzidas endogenamente e outras administradas exogenamente, recorrendo à energia fornecida por moléculas de ATP. Esta proteína está descrita como transportadora de conjugados orgânicos aniônicos, incluindo substâncias intervenientes na excreção de partículas tóxicas ao organismo, como glucoronidos (Fukuda and Schuetz, 2012). O efluxo ativo de toxinas previne a acumulação celular de toxinas não-conjugadas, prejudiciais ao organismo, mantendo o equilíbrio no potencial redox e no fluxo iónico (Deeley and Cole, 1997).

Um dos principais substratos da MRP1 é a glutathiona (GSH), que tem um papel relevante na ação defensiva contra xenobióticos tóxicos. A glutathiona é um tripeptídeo nucleófilo e uma espécie redutora, capaz de reagir com compostos eletrofílicos e com substâncias oxidantes potencialmente nocivas para a célula (Pompella *et al.*, 2003), sendo assim um antioxidante importante na homeostase celular.

A ação antioxidante da GSH pode também ser desempenhada através da sua participação em diversos sistemas antioxidantes presentes na célula. A associação entre GSH e a enzima redutase do desidroascorbato resulta na regeneração de ácido ascórbico (vitamina C) a partir da sua forma oxidada, recuperando assim um composto antioxidante essencial às células (Arrigoni and De Tullio, 2002; Pompella *et al.*, 2003).

Foi já descrito que a presença de ácido ascórbico aumenta a absorção de ferro ingerido, e que tem implicações na síntese e sobrevivência dos eritrócitos e leucócitos, assegurando uma melhor resposta imune. (Malone *et al.*, 1986).

A presença de alterações no gene que codifica a proteína MRP1 pode ter influência na sua expressão e/ou na função e na estrutura proteicas, originando alterações na resposta a substâncias endógenas ou exógenas e no stresse oxidativo. Variações genéticas no gene

MRP1 podem também influenciar a suscetibilidade para doenças em que o ambiente seja um fator relevante para o seu desenvolvimento (Wang *et al.*, 2005). O polimorfismo rs4148330, que ocorre na posição 16p13.11 da sequência de ADN, na região promotora do gene, está descrito como responsável por uma sobre-expressão da proteína em tumores sólidos e, conseqüentemente, como parte da resistência adquirida a fármacos através da sua redução intracelular. Neste caso, o número aumentado de proteínas de efluxo *MRP1* na membrana celular atua como barreira física na entrada de xenobióticos nas células. Este polimorfismo caracteriza-se pela permuta do nucleótido G pelo nucleótido A (G1666A), sendo que o alelo A tem uma frequência de 66,8% na população europeia (Munoz *et al.*, 2007; Ota *et al.*, 1995; Zhao, 2010).

1.5.4. Uridine-Cytidine Kinase 2 (UCK2)

A UCK2 (do inglês, *Uridine-cytidine kinase 2*), uma enzima da família das proteínas metabolizadoras, é codificada pelo gene *UCK2* localizado na posição 1q22-1q23.2, e foi identificada e caracterizada por Rompay (Van Rompay *et al.*, 2001, 1999).

A UCK2 catalisa a fosforilação dos nucleótidos de uridina e citidina em uridina monofosfato (UMP) e citidina monofosfato (CMP), respetivamente, dois produtos com funções anti-cancerígenas e anti-virais que intervêm em mecanismos como a regeneração das bainhas de mielina ou a biossíntese dos ácidos nucleicos (Negrão *et al.*, 2014; Sheffield, 1987; Suzuki *et al.*, 2004). A UCK2 pode também catalisar a fosforilação de ribonucleósidos citotóxicos análogos utilizados como agentes terapêuticos no tratamento do cancro, como a 5-azacitidina. Adicionalmente, a UCK2 tem um papel relevante na ativação farmacológica das bases análogas da uridina e da citidina, e a perda de função desta proteína foi já identificada em células resistentes aos análogos nucleosídicos (Sripayap *et al.*, 2013). Apesar disto, está descrito que em situações tumorais os níveis proteicos de UCK2 se encontram aumentados (Reichard and Sköld, 1957; Shen *et al.*, 1998; Van Rompay *et al.*, 2001).

A existência de modificações genéticas na sequência do *UCK2* pode alterar os níveis de expressão e, conseqüentemente, os níveis proteicos da UCK2. O polimorfismo rs2185268, que se situa na região intrónica do gene UCK2, representa uma substituição do nucleótido T pelo nucleótido G na posição 1:165811052, e pode influenciar a expressão da proteína metabolizadora. O nucleótido G aparece numa frequência de 40,7% na população europeia.

2. Objetivos

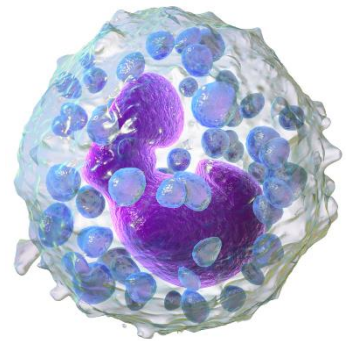


Imagem adaptada de
https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Blausen_gallery_2014#/media/File:Blausen_0077_Basophil.png

2. Objetivos

Considerando o interesse crescente no estudo dos efeitos dos polimorfismos, consideramos relevante avaliar a influência destas variações genéticas no desenvolvimento e progressão de neoplasias hematológicas.

Desta forma, pretendemos:

- ✎ Analisar os efeitos das variantes polimórficas dos genes *MDR1* (rs1045642), *MRP1* (rs4148330), *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561) no desenvolvimento de Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa, Mieloma Múltiplo e Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado;
- ✎ Avaliar a influência dos perfis genéticos associados aos genes que codificam as proteínas transportadoras *MDR1*, *MRP1*, *OCTN2*, e a proteína metabolizadora *UCK2* no desenvolvimento de neoplasias hematológicas;
- ✎ Relacionar as variantes polimórficas dos genes *MDR1*, *MRP1*, *UCK2* e *OCTN2* com a progressão das neoplasias hematológicas.

3. Materiais e métodos

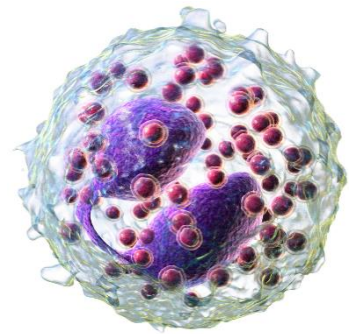


Imagem adaptada de

https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Blausen_gallery_2014#/media/File:Blausen_0352_Eosinophil.png

3. Materiais e métodos

3.1 Selecção e caracterização dos doentes e controlos

Neste estudo, participaram 471 indivíduos, dos quais 307 fazem parte do grupo das Neoplasias Hematológicas (NH) que se subdivide 162 em Neoplasias Mieloides (NM) e 145 referentes às Gamopatias Monoclonais (GM). Na categoria das NM, avaliaram-se 83 doentes com Síndrome Mielodisplásica, 63 doentes com Leucemia Mieloide Aguda e 16 doentes com Síndrome Mielodisplásica/Neoplasias Mieloproliferativas. Relativamente ao grupo das GM, foram analisados 77 doentes com Mieloma Múltiplo e 68 doentes com Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado. Foram também avaliados 164 controlos não neoplásicos e/ou indivíduos saudáveis.

A selecção e caracterização dos doentes com LMA, SMD, SMD/NMP, MM, MGUS e dos controlos não neoplásicos foram efetuadas no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC/HUC) e na consulta de Oncologia do Serviço de Medicina Interna do Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE, após consentimento informado e de acordo com os critérios internacionais, e as colheitas das amostras foram efetuadas entre 2010 e 2014.

3.2 Extração e quantificação do ADN genómico

A extração de ADN genómico do sangue periférico dos doentes com neoplasias mieloides, gamopatias monoclonais e dos controlos foi realizada através do protocolo de extração de amostras de sangue desenvolvido por Bartlett & White (Bartlett and White, 2006), após otimização do mesmo.

Desta forma, colocaram-se 500 µL de sangue periférico num tubo cónico de 10 mL e adicionaram-se 2 mL de solução de lise de glóbulos vermelhos, que contém 0.01 M Tris HCl (Tris Base, ULTROL® Grade, Calbioquem®), 320 mM Sucrose (D(+)-Sucrose, AppliChem), 5 mM de MgCl₂ e 1% Triton X100 (MpBiomedicals). De seguida, agitou-se a solução durante 4 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a mistura a 3000x g durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Seguidamente, adicionaram-se 160 µL de solução de lise celular, que contém 4 M Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,06 M EDTA (EDTA Na₂, MpBiomedicals) e 1% de SDS (SDS puro, AppliChem), e incubou-se a mistura no banho a 65°C durante 15 a 20 minutos. Após arrefecimento da solução até à temperatura ambiente, adicionaram-se 350 µL de clorofórmio frio e colocou-se numa placa giratória durante 30 a 60 minutos. Num passo seguinte e após centrifugação a 240x g durante 2 minutos, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e descartou-se o *pellet*. Ao sobrenadante adicionaram-se 420 µL de Etanol (MERCK) frio, com o objetivo de precipitar o ADN. Com o auxílio de uma pipeta estéril, recolheu-se o novelo de ADN para um novo tubo de 1,5 mL e deixou-se secar à temperatura ambiente para evaporação do etanol e, por fim, ressuspendeu-se o ADN em 100 µL de tampão de eluição.

Após a obtenção das amostras de ADN genómico, precedeu-se à quantificação da concentração e do grau de pureza por espectrofotometria de absorção, recorrendo ao *NanoDrop® 1000 Spectrophotometer*. O grau de pureza do ADN é determinado a partir da razão dos valores de absorvância a 260nm e a 280nm. Para a quantificação e determinação da pureza das amostras de ADN, usou-se como referência o tampão de eluição, no qual o ADN foi dissolvido e que se designou de branco, e foram consideradas como válidas apenas as amostras com grau de pureza entre 1,7 e 1,9 e com concentração de ADN superior a 100 ng/µL. As amostras foram posteriormente armazenadas a -20°C.

3.3 Análise dos polimorfismos dos genes *MDR1* (rs1045642), *MRP1* (rs4148330), *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561) e sequenciação de linhas celulares

Para a determinação dos genótipos dos genes *MDR1* (rs1045642) e *MRP1* (rs4148330), analisaram-se as amostras de ADN por RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*) e a análise dos perfis dos genes *UCK2* (T165811052G) e *OCTN2* (C132383536A) realizou-se por ARMS-PCR (*Amplification-Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*), utilizando como controlos linhas celulares representativas dos possíveis genótipos.

As linhas celulares foram sequenciadas utilizando o *kit* de sequenciação BigDye® Terminator v3.1, após purificação dos produtos com ExoSAP-IT®. A análise foi realizada utilizando o programa Chromas Lite, versão 2.01, e o alinhamento das sequências genéticas foi realizado com o auxílio das ferramentas Ensembl Genome Browser e Clustal Omega.

3.3.1 Análise dos polimorfismos dos genes *MDR1* (rs1045642) e *MRP1* (rs4148330) por RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*)

Para a análise dos polimorfismos rs1045642 e rs4148330 nos genes *MDR1* e *MRP1*, respetivamente, o ADN dos doentes e controlos foi amplificado através da técnica de RFLP-PCR pelo sistema iQ5 BioRad®, utilizando protocolos adaptados dos descritos por Taheri et al. (2010) e Zhao et al. (2010). Esta técnica consiste em amplificar fragmentos de ADN selecionados por primers de sequências complementares às sequências alvo e posterior restrição enzimática com endonucleases.

Desta forma, às amostras de ADN, com concentração aproximada de 100 ng/μL, foram adicionados um *primer* directo e um *primer* inverso (Tabela 1), mistura de dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina), cloreto de

magnésio (NZYTech), tampão da reacção (*Reaction Buffer for NZYTaq DNA polymerase*, NZYTech), DMSO (dimetilsulfóxido, *ChemCruz™*) e polimerase (*NZYTaq DNA polymerase*, NZYTech), descritos na tabela 2.

De seguida, procede-se a uma reacção de digestão dos produtos da amplificação, aos quais se adiciona uma mistura de enzima de restrição (*New England BioLabs*) na concentração de 1 U/ μ L e tampão (*New England BioLabs*) específico da enzima utilizada.

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados

	Primer	SNP	Sequência do primer	T _e (°C)	Tamanho dos fragmentos (pb)	Referência
RFLP-PCR	<i>MDR1F</i>	rs1045642	GCT GGT CCT GAA GTT GAT CTG TGA AC	61,0	TT – 238 CC – 172; 60 CT – 238; 172; 60	(Taheri et al., 2010)
	<i>MDR1R</i>		ACA TTA GGC AGT GAC TCG ATG AAG GCA			
	<i>MRP1F</i>	rs4148330	GCA ACA GCA TAA CTG GCA TT	58,0	AA – 160 GG – 89; 71 AG – 160; 89; 71	(Zhao et al., 2010)
	<i>MRP1R</i>		GAG ACC TCC CCC CAA TCA			
ARMS-PCR	<i>UCK2FW</i>	rs2185268	CTC AGG GAG CTT GTA TGT TTA GGT CTG A	63,8	Gene – 322 GG – 212 TT – 163 GT – 212; 163	*
	<i>UCK2RW</i>		TTA ACA CTT TCT GAC TCC TCT CCA CCT G			
	<i>UCK2FM</i>		ACT GGT TTC CTG TAG CAG TCA TTC TTT G			
	<i>UCK2RM</i>		AGG TGT AAA CAG CTA ACC ATG ACG CA			
	<i>OCTN2FW</i>	rs274561	CCT TTG TAA ACT ATG TGA ACA GCA ACC A	63,2	Gene – 496 CC – 317 AA – 233 CA – 317; 233	*
	<i>OCTN2RW</i>		TTA TCG AAA TAT GCA TCC TTG ACA CAA A			
	<i>OCTN2FM</i>		CAG GAA TTG CAT GCT TCC TAT GGT TTT			
	<i>OCTN2RM</i>		TTC TGA TTC AGG TTC AGT CCT TTT GAC C			

T_e, Temperatura de emparelhamento; pb, pares de bases; *, primers foram desenhados de acordo com as sequências intragénicas alvo, onde está localizada a variante polimórfica

Tabela 2 – Condições das reacções de RFLP-PCR e ARMS-PCR

Gene	Enzima de Restrição	Desnaturação inicial	Desnaturação	Emparelhamento	Extensão	Extensão final	Digestão	
			35 ciclos					
<i>MDR1</i>	Mbol	95°C, 5 min	95°C, 1 min	61,0°C, 45 seg	72°C, 30 seg	72°C, 10 min	37°C, <i>overnight</i>	
<i>MRP1</i>	MspI		95°C, 30 seg	58,0°C, 30 seg				
<i>UCK2</i>	-		95°C, 45 seg	63,8°C, 45 seg	72°C, 1 min			-
<i>OCTN2</i>	-			63,2°C, 45 seg				-

3.3.2 Análise dos polimorfismos dos genes UCK2 (rs2185268) e OCTN2 (rs274561) por ARMS-PCR (*Amplification-Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*)

Na análise dos polimorfismos dos genes *UCK2* e *OCTN2*, realizada pela técnica ARMS-PCR, no sistema referido previamente, foram desenhados *primers* específicos (Tabela 1) com o programa BatchPrimer3 (You et al., 2008). Os protocolos utilizados foram desenvolvidos especificamente para os *primers* desenhados. Nesta técnica, a amplificação do ADN é realizada através da adição de uma mistura de quatro *primers*, um direto e um inverso externos combinados com um direto e um inverso internos, dNTP's, cloreto de magnésio, DMSO, tampão da reação e polimerase.

O protocolo utilizado para a reação de PCR está descrito na Tabela 2. A par das amostras de ADN dos doentes e controlos, foram também amplificadas uma amostra de controlo sem ADN, que designamos de “branco”, e três linhas celulares representativas dos três genótipos possíveis para cada gene.

Após a amplificação das sequências de interesse, os produtos das PCR foram analisados em gel de agarose (NZYTech) a 4%, corado com *Midori Green Advance* (Nippon Genetics Europe GmbH) e utilizando o marcador de pesos moleculares de 100 pb (NZYDNA Ladder V, NZYTech), e posteriormente observados em luz ultravioleta.

3.4 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado utilizando os programas GraphPad Prism, versão 6, e SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 22.

Para a análise estatística dos perfis genéticos, avaliaram-se primeiramente as frequências alélica e genotípica e estimou-se se estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, um parâmetro que afirma que a variação genética de uma população se mantém constante

entre gerações consecutivas na ausência de fatores que perturbem este equilíbrio, e que se define pela equação $p^2+2pq+q^2=1$, onde p representa o alelo “A” e q representa o alelo “a”.

De forma a avaliar a força de associação entre as formas polimórficas e o risco de desenvolvimento de doença (NM, SMD, LMA, SMD/NMP, GM, MM, MGUS), calculou-se o risco relativo a partir de regressão logística (*Odds Ratio* – OR), utilizando os programas SPSS e GraphPad.

Para determinar os perfis genéticos, recorreu-se ao programa Arlequin (Excoffier et al., 2005).

A avaliação da influência dos polimorfismos na sobrevivência global dos doentes neoplásicos foi realizada pela análise de Kaplan-Meier.

Em todas as análises realizadas, considerou-se um nível de significado estatístico de 95% ($p<0,05$).

4. Resultados

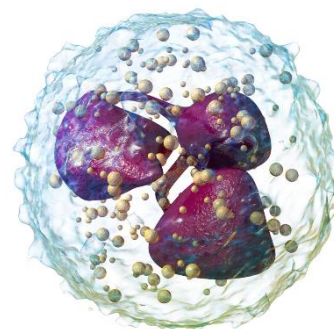


Imagem adaptada de

https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Blausen_gallery_2014#/media/File:Blausen_0676_Neutrophil.png

4. Resultados

4.1 Caracterização dos doentes hematológicos e dos controlos não neoplásicos

Este estudo foi realizado em 471 indivíduos, dos quais 307 (65,2%) com neoplasia hematológica e 164 (34,8%) controlos não neoplásicos.

Dos dados disponíveis, os doentes com Neoplasia Hematológica (NH) têm uma idade mediana de 68 anos (16 – 92 anos), sendo 48,9% (n=218) do género masculino e 51,1% (n=228) do género feminino. Este grupo divide-se em 162 (52,8%) casos de Neoplasia Mieloide (NM), do qual fazem parte os indivíduos diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa (SMD/NMP), e em 145 (47,2%) casos de Gamapatia Monoclonal (GM), que se subdivide em doentes com Mieloma Múltiplo (MM) e doentes com Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS). No grupo das NH, foram analisados 83 (27,0%) doentes com SMD, 63 (20,5%) doentes com LMA, 16 (5,2%) com SMD/NMP, 77 (25,1%) doentes com MM e 68 (22,1%) doentes com MGUS. Os doentes foram caracterizados segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), de acordo com as características displásicas e com a contagem de blastos.

Neste estudo foram ainda avaliados controlos não neoplásicos e/ou indivíduos saudáveis com uma mediana de idades de 58 anos (19 – 92 anos), dos quais, 49,2% (n=63) do género masculino e 50,8% (n=65) do género feminino, segundo os dados disponíveis. Estes dados estão representados graficamente na figura 6.

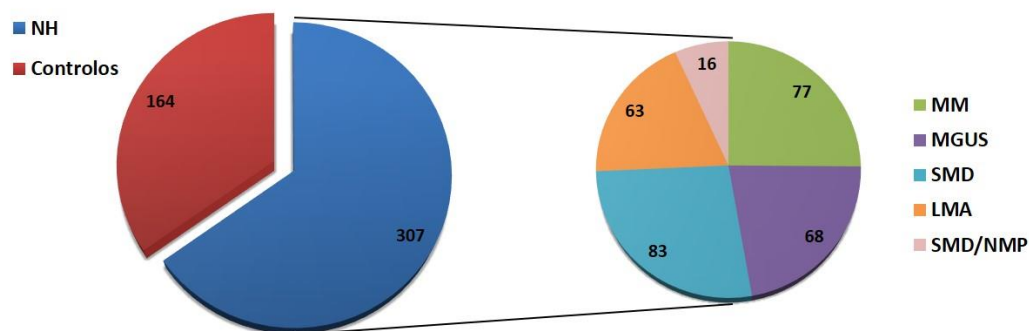


Figura 6 – Distribuição dos doentes de acordo com a patologia. Gráfico representativo do número total de amostras (A), agrupadas em controle (CTL) e neoplasias hematológicas (NH), que se dividem em (B) Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa (SMD/NMP), Mieloma Múltiplo (MM) e Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS)

4.2 Sequenciação das linhas celulares K562, F36-P, CEM e HEL

A sequenciação das linhas celulares K562, F36-P, CEM e HEL, foi realizada de modo a obtermos genótipos controle na análise genética. Uma vez que foram utilizados *primers* desenhados na caracterização genotípica dos genes *UCK2* e *OCTN2*, foi necessário comprovar os genótipos obtidos. Os dados resultantes da sequenciação estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Genotipagem dos SNP rs2185268 (UCK2) e rs274561 (OCTN2) K562, F36-P, CEM e HEL por sequenciação

Gene dbSNP	K562	F36-P	CEM	HEL
UCK2 rs2185268	TT	GT	GG	GT
OCTN2 rs274561	CC	CC	CC	AA

4.3 Caracterização genotípica das variantes polimórficas dos genes *MDR1*, *MRP1*, *UCK2* e *OCTN2* em doentes neoplásicos e em controlos não neoplásicos

Para determinar se existe associação genética entre as variantes polimórficas dos genes *MDR1*, *MRP1*, *UCK2* e *OCTN2* e as neoplasias Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa (SMD/NMP), Mieloma Múltiplo (MM) ou Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS), caracterizaram-se genotipicamente os 83 doentes com SMD, 63 com LMA, 16 com SMD/NMP, 77 com MM e 68 com MGUS, e ainda os 164 controlos não neoplásicos, a partir de amostras de sangue periférico (SP).

Para avaliar as variantes polimórficas dos genes *MDR1* (C3435T) e *MRP1* (G1666A), a análise genética foi realizada por restrição enzimática, através da técnica RFLP-PCR (protocolo descrito na secção 3.3.1, Tabela 2), utilizando as enzimas de restrição *Mbol* e *MspI*, respetivamente. Deste estudo, resultaram padrões diferenciados de bandas.

No caso do SNP referente ao gene *MDR1*, o padrão de bandas obtido corresponde a: uma banda com 238 pb para o genótipo TT; duas bandas, uma com 172 pb e outra com 60 pb, para o genótipo CC; e três bandas, uma de 239 pb, outra com 172 pb e uma última com 60 pb, para o genótipo heterozigótico CT (Figura 7A). Relativamente às variantes polimórficas do gene *MRP1*, observou-se uma banda com 160 pb respectiva ao genótipo AA; observaram-se duas bandas, de tamanhos de 89 pb e 71 pb, correspondentes ao genótipo GG; e três bandas, uma de 160 pb, outra de 89 pb e outra com 71 pb, codificando o genótipo heterozigótico AG (Figura 7B).

A avaliação genotípica dos genes *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561) foi realizada por ARMS-PCR, utilizando os protocolos descritos na secção 3.3.1, Tabela 2, e para os quais foram utilizados *primers* específicos desenhados para as variantes polimórficas em estudo. Desta análise, resultaram padrões de bandas correspondentes aos genótipos possíveis para cada SNP, que pudemos confirmar com os genótipos das linhas celulares K562, F36-P, HEL e CEM, previamente sequenciadas e de onde obtivemos os três genótipos possíveis (Secção 3.3.1, Tabela 1). Desta forma, no caso da avaliação do polimorfismo do gene *OCTN2*, resultou o seguinte padrão de bandas: uma banda de 496

pb, que corresponde ao gene e que está presente em todas as amostras e, adicionalmente, uma banda com 317 pb, que corresponde ao genótipo CC; uma banda de 233 pb, respeitante ao genótipo AA; ou duas bandas, uma com 317 pb e outra com 233 pb, que diz respeito ao genótipo heterozigótico AC (Figura 3C). Da avaliação genética do *UCK2*, resultaram: uma banda relativa ao gene (em todas as amostras) com 322 pb e, adicionalmente, uma banda com 212 pb, correspondente ao genótipo GG; uma banda de 163 pb relativa ao genótipo TT; ou duas bandas, uma com 212 pb e outra com 163 pb, referente ao genótipo heterozigótico GT (Figura 3D).

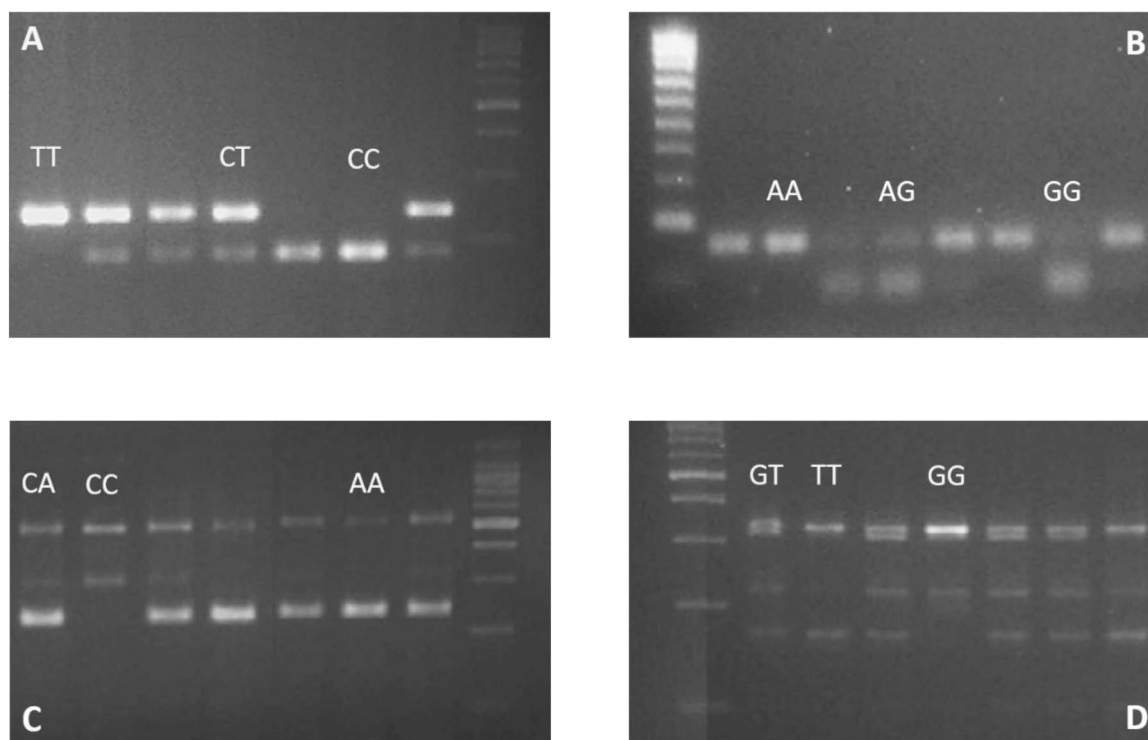


Figura 7 – Imagens representativas dos fragmentos dos genes *MDR1*, *MRP1*, *OCTN2* e *UCK2* em gel de electroforese (agarose a 4%). Imagens representativas da genotipagem dos polimorfismos nos (A) *MDR1* (rs1045642), (B) *MRP1* (rs4148330), (C) *OCTN2* (rs274561) e (D) *UCK2* (rs2185268).

4.4 Distribuições alélica e genotípica das variantes polimórficas dos genes *MDR1* (rs1045642), *MRP1* (rs4148330), *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561)

Para avaliar a frequência dos alelos nas populações neoplásicas, relativamente à população controlo, calcularam-se as frequências alélicas e genotípicas das variantes polimórficas dos genes *MDR1* (rs1045642), *MRP1* (rs4148330), *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561) nas diferentes populações, descritas nas tabelas 4 a 7.

4.4.1 Análise das frequências alélicas

Da análise da frequência alélica do polimorfismo rs1045642 (*MDR1*), verificou-se que, relativamente aos casos controlo (C, 50,4%; T, 49,6%) o grupo de doentes com NH apresentou maior frequência do nucleótido C (53,4%) e menor frequência do nucleótido T (46,6%), bem como o grupo de doentes com NM (C, 56,5%; T, 43,5%), com SMD (C, 60,2%; T, 39,8%), com LMA (C, 50,8%; T, 49,2%), com SMD/NMP (C, 60,0%; T, 40,0%) ou com MGUS (C, 52,2%; T, 47,8%). Contrariamente, os grupos de doentes com GM (C, 50,0%; T, 50,0%) ou com MM (C, 48,1%; T, 51,9%) apresentaram menor frequência do alelo C e maior frequência do alelo T, comparativamente aos casos controlo.

A avaliação da frequência alélica correspondente ao polimorfismo rs4148330 (*MRP1*), observou-se na análise que os doentes com NH (A, 72,1%; G, 27,9%), os doentes com GM (A, 67,9%; G, 32,1%), os indivíduos com SMD (A, 72,9%; G, 27,1%), ou com SMD/NMP (A, 66,7%; G, 33,3%), os casos de MM (A, 67,5%; G, 32,5%), os casos de MGUS (A, 68,4%; G, 31,6%), apresentam menor frequência do alelo A e maior frequência do alelo G quando comparados com a população controlo (A, 73,6%; G, 26,4%). Por sua vez, as populações com NM (A, 75,9%; G, 24,1%) e com LMA (A, 82,5%; G, 17,5%) apresentam maior frequência alélica do A e menor frequência alélica do C, relativamente aos controlos.

Relativamente à frequência dos alelos G e T, do polimorfismo rs2185268 (*UCK2*), verificou-se que a população de doentes com NH (G, 45,7%; T, 54,3%), com NM (G, 45,5%; T, 54,5%), com GM (G, 45,9%; T, 54,1%), com LMA (G, 45,8%; T, 54,2%), com SMD/NMP (G, 60,0%; T, 40,0%), com MM (G, 47,8%; T, 52,2%), com MGUS (G, 43,9%; T, 56,1%), exibem

maior frequência do alelo G e menor frequência do alelo T, quando comparados com a população controlo (G, 43,3%; T, 56,7%). O grupo de doentes com SMD (G, 42,5%; T, 57,5%) demonstra menor frequência alélica do G e maior frequência do alelo T, relativamente aos controlos.

No caso da frequência dos alelos C e A do polimorfismo rs274561 (*OCTN2*), quando comparados com os casos controlo não neoplásicos (C, 64,7%; A, 35,3%), os doentes com NH (C, 63,4%; A, 36,6%), com NM (C, 59,5%; A, 40,5%), com SMD (C, 56,3%; A, 43,7%), com LMA (C, 67,0%; A, 33,0%), com SMD/NMP (C, 50,0%; A, 50,0%), apresentam frequências do alelo C inferiores à observada nos controlos não neoplásicos e frequências do alelo A superiores à verificada no grupo controlo. Por outro lado, o grupo de doentes com GM (C, 67,6%; A, 32,4%), que inclui os doentes com MM (C, 66,2%; A, 33,8%) e os indivíduos diagnosticados com MGUS (C, 69,2%; A, 30,8%), exibem frequências do alelo C superiores à dos controlos e frequências do alelo A inferiores à dos casos controlo.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg não é respeitado pela totalidade das frequências alélicas observadas.

Tabela 4 – Frequências alélicas das variantes polimórficas dos genes *MDR1*, *MRP1*, *OCTN2* e *UCK2*

	MDR1		MRP1		UCK2		OCTN2	
	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)	G (%)	T (%)	C (%)	A (%)
P. Europeia*	45,5	54,5	66,8	33,2	40,7	59,3	62,4	37,6
CTL	50,4	49,6	73,6	26,4	43,3	56,7	64,7	35,3
NH	53,4	46,6	72,1	27,9	45,7	54,3	63,4	36,6
NM	56,5	43,5	75,9	24,1	45,5	54,5	59,5	40,5
GM	50,0	50,0	67,9	32,1	45,9	54,1	67,6	32,4
SMD	60,2	39,8	72,9	27,1	42,5	57,5	56,3	43,7
LMA	50,8	49,2	82,5	17,5	45,8	54,2	67,0	33,0
SMD/NMP	60,0	40,0	66,7	33,3	60,0	40,0	50,0	50,0
MM	48,1	51,9	67,5	32,5	47,8	52,2	66,2	33,8
MGUS	52,2	47,8	68,4	31,6	43,9	56,1	69,2	30,8

*, Os valores das frequências alélicas relativos à população europeia foram retirados da base de dados HapMap, de acordo com o dbSNP

4.4.2 Análise das frequências genotípicas

A frequência genotípica foi também analisada em todos os grupos neoplásicos e nos controlos não neoplásicos, comparando as frequências dos genótipos, de cada variante polimórfica dos genes em estudo, para cada grupo de doentes com as frequências genotípicas observadas no grupo dos controlos.

Da análise genotípica do polimorfismo do *MDR1* (rs1045642), observou-se uma diminuição da frequência do genótipo TT em todos os grupos avaliados (NH, 19,3%; NM, 19,9%; GM, 18,6%; SMD, 16,9%; LMA, 23,8%; SMD/NMP, 20,0%; MM, 16,9%; MGUS, 20,6%), relativamente ao grupo controlo (25,9%). Comparativamente aos controlos (26,6%), o genótipo CC apresentou frequência diminuída nas NH (26,1%), GM (18,6%), MM (13,0%) e MGUS (25,0%), e frequência aumentada nas condições NM (32,9%), SMD (37,3%), LMA (25,4%) e SMD/NMP (40,0%). Quanto ao genótipo CT, em comparação com os controlos não neoplásicos (47,5%), verificou-se um aumento de frequência nos grupos NH (54,6%), GM (62,8%), LMA (50,8%), MM (70,1%) e MGUS (54,4%), e uma diminuição de frequência nos grupos NM (47,2%), SMD (48,8%) e SMD/NMP (40,0%).

Quando se avaliou genotipicamente o polimorfismo do *MRP1* (rs4148330), as frequências do genótipo AA nos grupos NH (47,5%), GM (42,1%), SMD (47,0%), SMD/NMP (33,3%), MM (44,2%) e MGUS (39,7%) revelou-se diminuída relativamente com o grupo controlo (47,9%). Em comparação com o último grupo, as frequências dos grupos NM (52,5%) e LMA (65,0%) manifestaram-se aumentadas. Em relação ao genótipo GG, verificaram-se frequências genotípicas aumentadas nas populações NH (3,3%), GM (6,2%), SMD (1,2%), MM (9,1%) e MGUS (2,9%) e frequências genotípicas diminuídas nas populações NM (0,6%), LMA (0,0%) e SMD/NMP (0,0%), em relação à população controlo (0,7%). O genótipo AG apresentou-se numa frequência de 51,4% na população dos controlos não neoplásicos. Comparativamente a este valor, as populações GM (51,7%), SMD (51,8%), SMD/NMP (67,7%) e MGUS (57,4%) exibiram frequências superiores, e as populações NH (49,2%), NM (46,8%), LMA (35,0%) e MM (46,8%) exibiram frequências inferiores.

A avaliação das frequências dos genótipos referentes ao polimorfismo (rs2185268) do gene *UCK2* revelou que em todos os grupos neoplásicos estudados se verificou um aumento da frequência do genótipo TT (NH, 30,4%; NM, 31,0%; GM, 29,9%; SMD 28,8%; LMA 36,2%; SMD/NMP 26,7%; MM 27,9%; MGUS 31,8%), em relação ao grupo controlo (16,0%). Em relação ao genótipo GG, presente numa frequência de 29,3% nos controlos, observou-se um aumento da frequência no grupo SMD/NMP (46,77%) e uma diminuição nos restantes (NH, 21,8%; NM, 21,8%; GM, 21,6%; SMD, 13,8%; LMA, 27,6%; MM, 23,5%; MGUS, 19,7%). No caso do genótipo GT, com uma frequência de 54,7% nos casos controlo, observou-se um aumento da frequência nos doentes com SMD (57,5%) e uma diminuição da mesma nos doentes dos outros grupos (NH, 47,8%; NM, 47,2%; GM, 48,5%; LMA, 36,2%; SMD/NMP, 26,7%; MM, 48,5%; MGUS, 48,5%).

Relativamente ao polimorfismo (rs274561) do gene *OCTN2*, a análise do genótipo CC revelou aumento na frequência genotípica em todos os grupos de neoplasias (NH, 15,5%; NM, 17,0%; GM, 14,0%; SMD 17,7%; LMA 15,1%; SMD/NMP 20,0%; MM 14,1%; MGUS 13,8%), comparativamente ao grupo controlo (12,0%). O genótipo AA apresenta frequência aumentada nas populações NH (42,5%), GM (49,3%), LMA (49,1%), MM (46,5%) e MGUS (52,3%) e frequência diminuída nas populações NM (36,1%), SMD (30,4%), SMD/NMP (20,0%), em relação à população controlo que apresenta uma frequência de 41,3%. O genótipo heterozigótico AC surge na população controlo numa frequência de 46,7%, em relação à qual se verifica um aumento de frequência nos grupos NM (46,9%), SMD (51,9%) e SMD/NMP (60,0%), e uma diminuição na frequência nos grupos NH (42,0%), GM (36,8%), LMA (35,8%), MM (39,4%) e MGUS (33,8%).

4.4.3 Análise do risco relativo associado aos genótipos individuais dos genes MDR1, MRP1, UCK2 e OCTN2

De modo a analisar se a presença de determinada variante polimórfica confere risco ou efeito protetor no desenvolvimento de doença (NH, NM, GM, SMD, LMA, SDM/NMP, MM, MGUS), realizou-se a análise do risco associado (*Odds ratio*) por regressão logística. Analisaram-se os genótipos individuais e avaliou-se se a presença de um alelo é suficiente para causar efeito (Modelo Dominante, MD) ou se é necessária a presença de dois alelos para que o efeito se verifique (Modelo Recessivo, MR).

Como se pode observar na tabela 5, embora relativamente ao grupo das Neoplasias Hematológicas (NH) e ao grupo das Neoplasias Mieloides (NM) os polimorfismos estudados não pareçam influenciar, no grupo das Gamopatias Monoclonais (GM) revelou-se um aumento no risco para o seu desenvolvimento, nomeadamente um risco aumentado em 1,84x (IC95% 1,02 – 3,32; $p=0,043$) na presença do genótipo heterozigótico CT da variante polimórfica do gene *MDR1*. Observou-se ainda que, no polimorfismo do *MRP1*, o genótipo GG confere um risco 10,18x (IC95% 1,25 – 82,68; $p=0,030$) aumentado para o desenvolvimento de GM, e a presença de genótipos portadores do alelo A representa um risco aumentado em 9,46x para o desenvolvimento de GM (IC95% 1,18 – 75,69; $p=0,034$), sendo estes resultados estatisticamente significativos. Relativamente aos genótipos CC e TT do *MDR1*, incluindo as avaliações dos MD e MR, não foram observados resultados com significado estatístico, assim como as avaliações do risco associado aos genes *UCK2* e *OCTN2* não se revelaram significativas.

Tabela 5. Frequências genotípicas e odds ratio relativos às Neoplasias Hematológicas, Neoplasias Mieloides e Gamopatias Monoclonais

Gene: dbSNP	Controles		Neoplasias Hematológicas				Neoplasias Mieloides				Gamopatias Monoclonais			
	n	%	n	%	OR (95% IC)	p	n	%	OR (95% IC)	p	n	%	OR (95% IC)	p
MDR1: rs1045642														
TT	36	25,9	59	19,3	Ref.		32	19,9	Ref.		27	18,6	Ref.	
CC	37	26,6	80	26,1	1,32 (0,75-2,33)	0,340	53	32,9	1,61 (0,85-3,04)	0,141	27	18,6	0,97 (0,48-1,97)	0,939
CT	66	47,5	167	54,6	1,54 (0,93-2,55)	0,091	76	47,2	1,29 (0,73-2,31)	0,381	91	62,8	1,84 (1,02-3,32)	0,043
Modelo Dominante					1,46 (0,91-2,35)	0,115			0,71 (0,41-1,22)	0,215			1,53 (0,87-2,69)	0,141
Modelo Recessivo					0,98 (0,62-1,54)	0,916			0,91 (0,56-1,47)	0,948			0,63 (0,36-1,11)	0,108
MRP1: rs4148330														
AA	69	47,9	144	47,5	Ref.		83	52,5	Ref.		61	42,1	Ref.	
GG	1	0,7	10	3,3	4,79 (0,60-38,19)	0,139	1	0,6	0,83 (0,05-13,54)	0,897	9	6,2	10,18 (1,25-82,68)	0,030
AG	74	51,4	149	49,2	0,97 (0,65-1,44)	0,861	74	46,8	0,83 (0,53-1,31)	0,425	75	51,7	1,15 (0,72-1,84)	0,570
Modelo Dominante					1,02 (0,68-1,51)	0,938			0,83 (0,53-1,31)	0,423			1,27 (0,80-2,02)	0,318
Modelo Recessivo					4,88 (0,62-38,50)	0,132			0,91 (0,06-14,70)	0,948			9,46 (1,18-75,69)	0,034
UCK2: rs2185268														
TT	12	16,0	84	30,4	Ref.		44	31,0	Ref.		40	29,9	Ref.	
GG	22	29,3	60	21,8	1,31 (0,60-2,85)	0,497	31	21,8	1,29 (0,56-2,99)	0,550	29	21,6	1,33 (0,57-3,11)	0,512
GT	41	54,7	132	47,8	0,84 (0,47-1,51)	0,568	67	47,2	0,82 (0,43-1,55)	0,538	65	48,5	0,87 (0,46-1,67)	0,680
Modelo Dominante					0,95 (0,54-1,66)	0,854			0,93 (0,50-1,70)	0,801			0,98 (0,53-1,81)	0,937
Modelo Recessivo					1,46 (0,74-2,88)	0,277			1,46 (0,70-3,06)	0,307			1,45 (0,69-3,04)	0,326
OCTN2: rs274561														
CC	9	12,0	44	15,5	Ref.		25	17,0	Ref.		19	14,0	Ref.	
AA	31	41,3	120	42,5	0,79 (0,35-1,80)	0,576	53	36,1	0,61 (0,26-1,49)	0,280	67	49,2	1,02 (0,42-2,52)	0,959
AC	41	46,7	119	42,0	0,70 (0,31-1,56)	0,380	69	46,9	0,71 (0,30-1,68)	0,436	50	36,8	0,68 (0,27-1,67)	0,397
Modelo Dominante					0,74 (0,34-1,60)	0,443			0,67 (0,29-1,51)	0,330			0,84 (0,36-1,96)	0,687
Modelo Recessivo					1,05 (0,62-1,75)	0,868			0,80 (0,45-1,42)	0,443			1,38 (0,78-2,44)	0,270

Os valores de OR (IC 95%) e o valor de p foram calculados por regressão logística de acordo com os modelos a seguir descritos: modelo codominante (DD vs. DD, DD vs. Dd, and DD vs. Dd, ou seja, cada genótipo foi comparado com o genótipo homozigótico para o alelo mais frequente, tido como referência); o modelo dominante (DD vs. Dd + dd); e o modelo recessivo (DD + Dd vs. dd). Os valores a negrito realçam os resultados com significado estatístico. D, alelo mais frequente; d, alelo menos frequente; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; Ref., referência.

Como podemos verificar na tabela 6, da avaliação de risco associado a cada uma das NM, sendo elas SMD, LMA e SMD/NMP, o facto de o indivíduo ter um genótipo portador do alelo G, da variante polimórfica do *MRP1*, tem um efeito protetor no desenvolvimento de LMA, sendo este 0,50x do valor respetivo nos casos controlo, com um $p=0,027$ (IC95% 0,27 – 0,92). Adicionalmente, observou-se que indivíduos portadores do genótipo AG do gene *MRP1* têm metade da probabilidade de desenvolver LMA (OR=0,5; IC95% 0,27 – 0,94; $p=0,030$) Verificou-se ainda que a presença do genótipo GG, da variante polimórfica do gene *UCK2*, representa um risco 4,59x aumentado para o desenvolvimento de SMD/NMP (IC95% 1,40 – 15,06; $p=0,012$). As restantes análises não se traduziram em resultados estatisticamente significativos.

Tabela 6. Frequências genotípicas e odds ratio relativos às Neoplasias Mieloides (Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa)

Gene:bsNP	Controlos				SMD				LMA				SMD/NMP	
	n	%	n	%	OR (95% IC)	p	n	%	OR (95% IC)	p	n	%	OR (95% IC)	p
MDR1: rs1045642														
TT	36	25,9	14	16,9	Ref.		15	23,8	Ref.		3	20,0	Ref.	
CC	37	26,6	31	37,3	2,15 (0,99-4,70)	0,054	16	25,4	1,04 (0,45-2,41)	0,931	6	40,0	1,95 (0,45-8,38)	0,371
CT	66	47,5	38	45,8	1,48 (0,71-3,09)	0,295	32	50,8	1,16 (0,56-2,43)	0,686	6	40,0	1,09 (0,26-4,62)	0,906
Modelo Dominante					1,72 (0,87-3,43)	0,122			1,12 (0,56-2,24)	0,752			1,40 (0,37-5,24)	0,619
Modelo Recessivo					1,64 (0,92-2,94)	0,095			0,94 (0,46-1,85)	0,855			1,84 (0,61-5,52)	0,278
MRP1: rs4148330														
AA	69	47,9	39	47,0	Ref.		39	65,0	Ref.		5	33,3	Ref.	
GG	1	0,7	1	1,2	0,57 (0,03-9,29)	0,690	0	0,0	-	-	0	0,0	-	-
AG	74	51,4	43	51,8	1,03 (0,60-1,77)	0,920	21	35,0	0,50 (0,27-0,94)	0,030	10	66,7	1,87 (0,61-5,73)	0,277
Modelo Dominante					1,04 (0,60-1,78)	0,893			0,50 (0,27-0,92)	0,027			1,84 (0,60-5,65)	0,287
Modelo Recessivo					1,74 (0,11-28,25)	0,696			-	-			-	-
UCK2: rs2185268														
TT	12	16,0	23	28,8	Ref.		17	36,2	Ref.		4	26,7	Ref.	
GG	22	29,3	11	13,8	0,88 (0,32-2,40)	0,798	13	27,6	1,40 (0,51-3,84)	0,511	7	46,6	3,21 (0,78-13,22)	0,107
GT	41	54,7	46	57,4	1,07 (0,52-2,21)	0,848	17	36,2	0,54 (0,23-1,25)	0,151	4	26,7	0,56 (0,12-2,34)	0,410
Modelo Dominante					1,03 (0,51-2,06)	0,936			0,73 (0,34-1,59)	0,431			1,14 (0,33-3,98)	0,835
Modelo Recessivo					0,84 (0,35-2,03)	0,694			2,01 (0,83-4,88)	0,123			4,59 (1,40-15,06)	0,012
OCTN2: rs274561														
CC	9	12,0	14	17,7	Ref.		8	15,1	Ref.		3	20,0	Ref.	
AA	31	41,3	24	30,4	0,50 (0,18-1,34)	0,168	26	49,1	0,94 (0,32-2,79)	0,916	3	20,0	0,29 (0,05-1,69)	0,169
AC	41	46,7	41	51,9	0,75 (0,29-1,95)	0,559	19	35,8	0,61 (0,20-1,84)	0,381	9	60,0	0,77 (0,17-3,45)	0,734
Modelo Dominante					0,63 (0,26-1,57)	0,322			0,77 (0,28-2,14)	0,612			0,55 (0,13-2,31)	0,411
Modelo Recessivo					0,62 (0,32-1,20)	0,157			1,37 (0,67-2,77)	0,387			0,36 (0,09-1,36)	0,131

Os valores de OR (IC 95%) e o valor de *p* foram calculados por regressão logística de acordo com os modelos a seguir descritos: modelo codominante (DD vs. DD, DD vs. Dd, and DD vs. dd). Ou seja, cada genótipo foi comparado com o genótipo homozigótico para o alelo mais frequente, tido como referência); o modelo dominante (DD vs. Dd + dd); e o modelo recessivo (DD + Dd vs. dd). Os valores a negrito realçam os resultados com significado estatístico.

D, alelo mais frequente; m, alelo menos frequente; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; SMD, Síndrome Mielodisplásica; LMA, Leucemia Mieloide Aguda; SMD/NMP, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa; Ref., referência.

Na tabela 7 pode observar-se que, da análise do OR associado a cada uma das GM, sendo elas MM e MGUS, observou-se que o genótipo heterozigótico CT do *MDR1* traduz-se num risco aumentado 2,27x para o desenvolvimento de MM (IC95% 1,09 – 4,70; $p=0,028$) e a presença do genótipo CC do polimorfismo do gene *MDR1* representa um efeito protetor, com um valor correspondente a 0,41x (IC95% 0,19 – 0,88; $p=0,023$) para o desenvolvimento de MM.

No que diz respeito às variantes polimórficas do gene *MRP1*, o genótipo GG revelou-se um fator de risco de desenvolvimento de MM (OR=14,21; IC95% 1,68 – 120,16; $p=0,015$), e um fator de risco 14,30x (IC95% 1,73 – 118,51; $p=0,014$) aumentado para o desenvolvimento da mesma doença. A presença de genótipos portadores do alelo C da variante polimórfica do *MDR1*, ou a presença de genótipos portadores do alelo G da variante polimórfica do gene *MRP1*, e todas as condições genotípicas estudadas referentes às variantes polimórficas dos genes *UCK2* e *OCTN2* não se manifestaram estatisticamente relevantes. A condição patológica MGUS não evidenciou associações estatisticamente significativas com as variantes polimórficas de nenhum dos genes em estudo. (Tabela 7)

Tabela 7. Frequências genotípicas e odds ratio relativos às Gamopatias Monoclonais (Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado e Mieloma Múltiplo)

Gene:dbSNP	Controles				MGUS			MM		
	n	%	n	%	OR (95% IC)	p	n	%	OR (95% IC)	p
MDR1: rs1045642										
TT	36	25,9	14	20,6	Ref.		13	16,9	Ref.	
CC	37	26,6	17	25,0	1,81 (0,51-2,75)	0,698	10	13,0	0,75 (0,29-1,92)	0,547
CT	66	47,5	37	54,4	1,44 (0,69-3,01)	0,331	54	70,1	2,27 (1,09-4,70)	0,028
Modelo Dominante					1,35 (0,67-2,71)	0,403			1,72 (0,85-3,49)	0,132
Modelo Recessivo					0,92 (0,47-1,79)	0,803			0,41 (0,19-0,88)	0,023
MRP1: rs4148330										
AA	69	47,9	27	39,7	Ref.		34	44,1	Ref.	
GG	1	0,7	2	2,9	5,11 (0,45-58,72)	0,190	7	9,1	14,21 (1,68-120,16)	0,015
AG	74	51,4	39	57,4	1,35 (0,75-2,43)	0,323	36	46,8	0,99 (0,56-1,75)	0,965
Modelo Dominante					1,40 (0,78-2,51)	0,263			1,16 (0,67-2,03)	0,593
Modelo Recessivo					4,33 (0,39-48,64)	0,235			14,3 (1,73-118,51)	0,014
UCK2: rs2185268										
TT	12	16,0	21	31,8	Ref.		19	27,9	Ref.	
GG	22	29,3	13	19,7	1,14 (0,42-3,04)	0,801	16	23,5	1,54 (0,59-4,06)	0,379
GT	41	54,7	32	48,5	0,82 (0,38-1,74)	0,602	33	48,6	0,93 (0,43-2,01)	0,857
Modelo Dominante					0,89 (0,43-1,82)	0,749			1,07 (0,52-2,21)	0,854
Modelo Recessivo					1,29 (0,54-3,06)	0,567			1,62 (0,70-3,72)	0,260
OCTN2: rs274561										
CC	9	12,0	9	13,8	Ref.		10	14,1	Ref.	
AA	31	41,3	34	52,4	1,10 (0,39-3,12)	0,862	33	46,5	0,96 (0,34-2,67)	0,935
AC	41	46,7	22	33,8	0,63 (0,22-1,83)	0,394	28	39,4	0,72 (0,26-2,01)	0,531
Modelo Dominante					0,85 (0,32-2,28)	0,745			0,83 (0,32-2,18)	0,709
Modelo Recessivo					1,56 (0,80-3,04)	0,195			1,23 (0,64-2,37)	0,531

Os valores de OR (IC 95%) e o valor de *p* foram calculados por regressão logística de acordo com os modelos a seguir descritos: modelo codominante (DD vs. DD, DD vs. Dd, and DD vs. dd. Ou seja, cada genótipo foi comparado com o genótipo homozigótico para o alelo mais frequente, tido como referência); o modelo dominante (DD vs. Dd + dd); e o modelo recessivo (DD + Dd vs. dd). Os valores a negrito realçam os resultados com significado estatístico.

D, alelo mais frequente; m, alelo menos frequente; OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; MGUS, Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado; MM, Mieloma Múltiplo; Ref., referência.

4.4.4 Análise do risco relativo associado aos perfis genéticos *MDR1*, *MRP1*, *UCK2* e *OCTN2*

Para testar o potencial risco de desenvolver neoplasias hematológicas (NH, NM, GM, SMD, LMA, SDM/NMP, MM, MGUS) associado às combinações dos genótipos relativos aos polimorfismos dos genes *MDR1* (C3435T, rs1045642), *MRP1* (G1666A, rs4148330), *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561), calculou-se o *odds ratio* (OR) para cada combinação possível, pelo teste exato de Fisher.

Para realizar esta análise, recorreu-se ao programa Arlequin, que inferiu os perfis genéticos existentes na amostra de casos avaliada, resultando num total de 59 perfis distintos. O risco de desenvolver alguma das NH em estudo associado aos perfis obtidos foi calculado com o auxílio do programa GraphPad.

A avaliação do risco associado aos perfis genéticos não revelou resultados com significado estatístico, como está descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Risco relativo associado aos perfis genéticos em Neoplasias Hematológicas (Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa, Mieloma Múltiplo, Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado)

Perfil (MDR1, MRP1, UGT2, OCTN2)	SMD		LMIA		SMD/NMP		MM		MGUS	
	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
1. CC AA GG AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. CC AA GG AC	-	-	-	-	-	-	1,94 (0,17-21,94)	1,000	-	-
3. CC AA GT AA	0,54 (0,10-3,06)	0,684	-	-	0,43 (0,04-5,12)	0,461	1,94 (0,17-21,94)	1,000	1,86 (0,16-20,97)	1,000
4. CC AA GT AC	0,73 (0,12-4,53)	1,000	1,30 (0,11-14,82)	1,000	-	-	-	-	0,91 (0,12-6,68)	1,000
5. CC AA GT CC	1,14 (0,07-18,16)	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-
6. CC AA TT AA	2,26 (0,20-25,50)	0,603	-	-	-	-	1,94 (0,17-21,94)	1,000	0,91 (0,12-6,68)	1,000
7. CC AA TT AC	0,55 (0,04-6,20)	1,000	-	-	-	-	0,96 (0,06-15,62)	1,000	-	-
8. CC AA TT CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. CC AG GG AA	2,26 (0,20-25,50)	0,603	-	-	-	-	0,96 (0,13-6,99)	1,000	-	-
10. CC AG GG AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. CC AG GG CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12. CC AG GT AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. CC AG GT AC	1,12 (0,27-4,65)	1,000	2,69 (0,29-24,84)	0,647	0,90 (0,09-8,60)	0,896	1,97 (0,35-11,13)	0,681	3,82 (0,42-35,13)	0,368
14. CC AG GT CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15. CC AG TT AA	0,83 (0,18-3,83)	1,000	-	-	-	-	-	-	0,91 (0,18-4,69)	1,000
16. CC AG TT AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. CC AG TT CC	1,11 (0,07-18,16)	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-
18. CC GG GT AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19. CC GG GT AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20. CT AA GG AA	0,55 (0,05-6,20)	1,000	0,64 (0,04-10,55)	1,000	-	-	0,31 (0,03-3,05)	0,359	0,45 (0,04-5,09)	0,606
21. CT AA GG AC	2,26 (0,20-25,50)	0,603	1,30 (0,11-14,82)	1,000	-	-	1,94 (0,17-21,94)	1,000	1,86 (0,16-20,97)	1,000
22. CT AA GG AC	-	-	-	-	0,21 (0,01-3,62)	0,336	0,96 (0,06-15,62)	1,000	-	-
23. CT AA GT AA	2,92 (0,55-15,54)	0,256	1,09 (0,25-4,78)	1,000	-	-	1,64 (0,38-7,15)	0,719	0,74 (0,22-2,57)	0,757
24. CT AA GT AC	0,54 (1,3-2,23)	0,500	0,36 (0,08-1,59)	0,260	-	-	0,71 (0,15-3,28)	0,715	-	-
25. CT AA GT CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26. CT AA TT AA	-	-	0,64 (0,09-4,70)	0,645	-	-	0,96 (0,13-6,99)	1,000	0,35 (0,07-1,86)	0,259
27. CT AA TT AC	0,55 (0,05-6,20)	1,000	0,20 (0,02-2,03)	0,298	0,21 (0,01-3,62)	0,336	0,31 (0,03-3,05)	0,359	0,91 (0,06-14,93)	1,000
28. CT AA TT CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29. CT AG GG AA	-	-	0,64 (0,09-4,70)	0,645	0,43 (0,04-5,12)	0,461	0,46 (0,08-2,62)	0,435	1,86 (0,16-20,97)	1,000

4.5 Avaliação da influência dos polimorfismos nos genes *MDR1*, *MRP1*, *UCK2* e *OCTN2* na sobrevivência global dos doentes oncológicos

Para avaliar o efeito dos polimorfismos *MDR1* (rs1045642), *MRP1* (rs4148330), *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561) na sobrevivência global dos indivíduos com neoplasias hematológicas, realizou-se a análise de Kaplan-Meier.

A análise de Kaplan-Meier revelou que indivíduos com genótipo GG na variante polimórfica do gene *UCK2* têm uma sobrevivência global reduzida em 11 meses (GG – $31,1 \pm 3,8$ meses; TT ou GT – $42,8 \pm 0,8$ meses; $p=0,017$). Os restantes genótipos avaliados não se manifestaram relevantes no prognóstico da sobrevivência de doentes com SMD, LMA, SMD/NMP e MGUS (Figura 8).

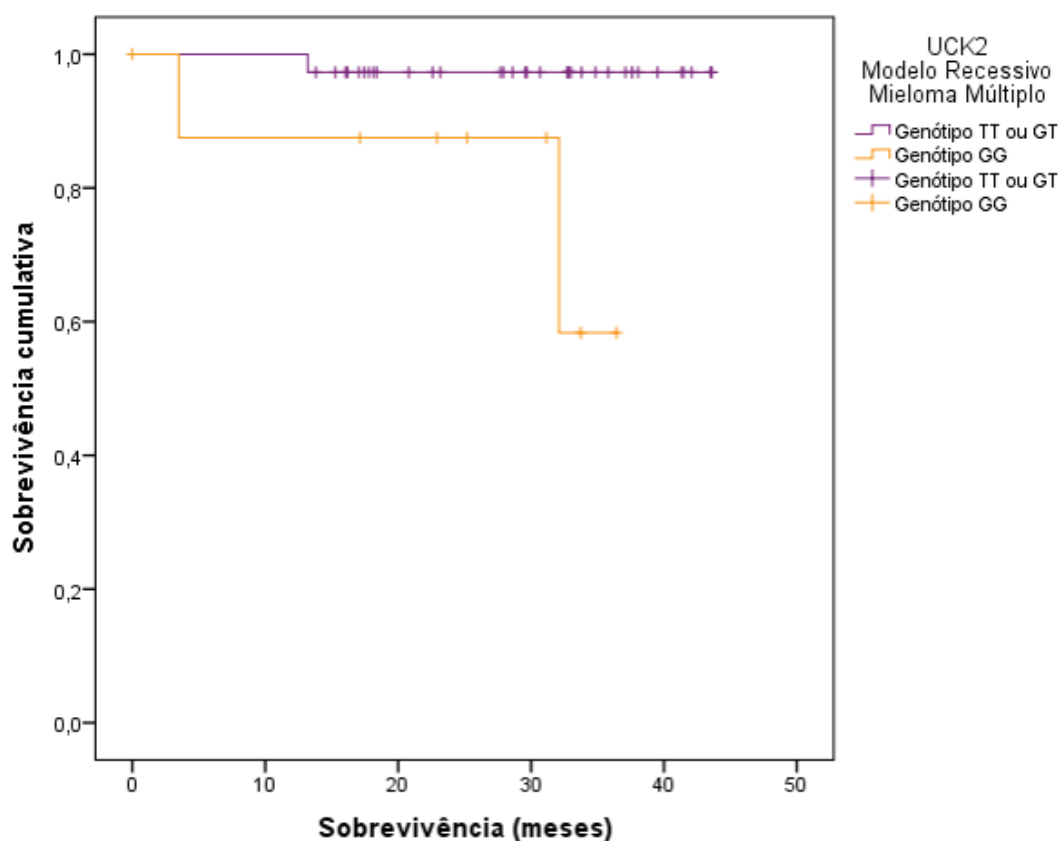


Figura 8 – Gráfico representativo da influência das variantes polimórficas do gene *UCK2* na sobrevivência global de doentes com Mieloma Múltiplo.

5. Discussão

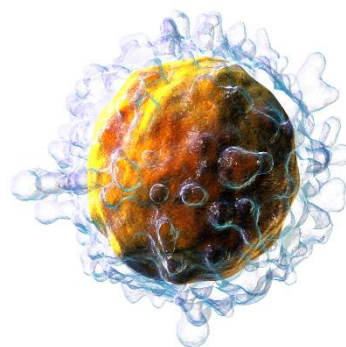


Imagem adaptada de

https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Blausen_gallery_2014#/media/File:Blausen_0625_Lymphocyte_T_cell.png

5. Discussão

O cancro é uma das maiores causas de mortalidade e de morbilidade, estando previsto um aumento da sua incidência em 70% nos próximos vinte anos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (“www.who.com,” 2015).

Os mecanismos de controlo de crescimento e proliferação celulares estão alterados em caso de cancro, desregulando as funções de diferenciação e multiplicação celulares. Diversos fatores podem originar estas alterações que levam uma célula normal a transformar-se numa célula cancerígena, como fatores genéticos individuais e agentes carcinogénicos endógenos e/ou exógenos, sejam eles físicos, químicos ou biológicos. O aumento da idade está diretamente associado a um aumento da incidência tumoral, pela acumulação de fatores de risco e na diminuição dos mecanismos reparadores da célula (Lodish and Berk, 2008).

A quimioterapia é uma das principais terapêuticas utilizadas no tratamento do cancro e consiste na administração de fármacos. Os fármacos administrados serão absorvidos pelo organismo, transportados até ao alvo, ativados quando necessário e, por último, eliminados do sistema. Para que isto ocorra, são necessárias múltiplas proteínas facilitadoras do processo, incluindo proteínas transportadoras e metabolizadoras de substrato (Rang et al., 2012).

Os polimorfismos são um tema com grande interesse científico, com cada vez mais associações relevantes a casos tumorais. À medida que a investigação das consequências das mutações pontuais se desenrola, encontram-se mais associações entre a componente genética e o desenvolvimento e progressão de cancro, dado o seu potencial de serem utilizados como biomarcadores moleculares na identificação de genes intimamente associados a doenças complexas, e como ferramentas auxiliares em estudos farmacogenómicos (Sobrinho et al., 2005).

Conforme as consequências funcionais dos genes afetados, a presença de determinado polimorfismo pode ter diferentes denominações. As mutações pontuais podem ter efeitos deletérios, neutros ou benéficos e podem surgir em qualquer parte do genoma, resultando em alterações na maquinaria da tradução e na expressão genética ou em genes que codificam proteínas transportadoras de influxo ou de efluxo (Ileiri et al., 2006; Kroeger et al., 1997; Nishizato et al., 2003).

O transporte de substratos entre os meios intra- e extracelular é mediado por mecanismos membranares especializados que se dividem em dois grandes grupos, o das proteínas *solute carrier* (SLC), que é responsável pelo transporte passivo de solutos a favor do gradiente eletroquímico, e o das proteínas da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que necessitam de ativação através de ligação a moléculas de ATP, realizando transporte ativo dos substratos. Além dos substratos endógenos, estas moléculas também reconhecem múltiplos fármacos utilizados na quimioterapia e foram já identificadas em diversos casos tumorais. As proteínas metabolizadoras medeiam a ativação do fármaco, definindo assim mais uma etapa na eficácia da terapêutica, e também estas foram já relacionadas com tumores (Sai and Tsuji, 2004).

Neste contexto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a associação entre o risco relativo de desenvolver condições neoplásicas. As condições avaliadas nas neoplasias hematológicas foram as variantes polimórficas dos genes *MDR1* (rs1045642), *MRP1* (rs4148330), *UCK2* (rs2185268) e *OCTN2* (rs274561), tendo por base as taxas de aparecimento de cada alelo e de cada genótipo e as combinações das características genotípicas dos quatro genes em estudo.

Para tal, foi analisado um universo de 471 casos, dos quais 164 controlos não neoplásicos e 307 doentes neoplásicos com Neoplasias Mieloides (NM) ou com Gamapatias Monoclonais (GM). O grupo das NM inclui casos de SMD, LMA, SMD/NMP, e o grupo das GM engloba MM e MGUS.

5.1 *Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1)*

A glicoproteína-P é a proteína mais estudada da família dos transportadores pela sua função de extrusão de substâncias potencialmente adversas às células e pela sua possível associação a resistência adquirida a fármacos. A MDR1 é assim um mecanismo de defesa do organismo, servindo de barreira na entrada de compostos em células em tecidos (Brinkmann and Eichelbaum, 2001).

Esta molécula tem também um papel relevante na absorção, distribuição e eliminação de diversos fármacos e geralmente funciona como equilíbrio das concentrações dos substratos como alcaloides de vinca ou antraciclinas, contrabalançando a tendência dos transportadores SLC (Hoffmeyer et al., 2000; Ueda et al., 1987; Widmer et al., 2007).

A existência de variações genéticas neste gene podem modificar a expressão e regulação do gene *MDR1*, podendo aumentar ou diminuir o número de proteínas produzidas ou a sua função (Fung and Gottesman, 2009; Hoffmeyer et al., 2000).

O alelo T do polimorfismo rs1045642, no exão 26, resulta na redução da expressão proteica (Cavaco et al., 2003; Evans and Mcleod, 2003; Hoffmeyer et al., 2000) mas potencia a sua capacidade funcional (Evans and Mcleod, 2003; Hoffmeyer et al., 2000; Ueda et al., 1987). Estas consequências ocorrem especialmente em casos de genótipo TT (Hitzl et al., 2001; Hoffmeyer et al., 2000). A redução da expressão da proteína MDR1 terá como resultado a acumulação de compostos com efeitos adversos ao correto funcionamento celular, podendo resultar em apoptose da célula (Hattori et al., 2007).

A alteração da expressão da proteína MDR1 por variações localizadas em zonas exónicas, pode resultar de uma associação entre o polimorfismo C3435T e SNP não identificados na região promotora/na região 3' UTR (do inglês, *Untranslated Region*) que afete a transcrição e reduza os níveis de mRNA (Fung and Gottesman, 2009).

As alterações resultantes do polimorfismo C3435T podem ainda, em caso de tratamento oncológico, traduzir-se numa maior eficácia de efluxo de fármacos, acumulando-se fármaco no meio extracelular e, possivelmente, aumentando a perspetiva

de resistência adquirida, diminuindo assim a eficácia da terapêutica (Brinkmann and Eichelbaum, 2001; Fung and Gottesman, 2009). O polimorfismo C3435T foi já relacionado com diversas neoplasias hematológicas como Mieloma Múltiplo, identificado como fator benéfico na resposta à terapêutica através da perda de função da MDR1 e consequente acumulação de fármaco no interior das células tumorais (Drain et al., 2009), Leucemia Mieloide Crónica, em que existem melhorias na resposta ao tratamento com Imatinib (Maffioli et al., 2011), Leucemia Linfoblástica Crónica (Sava et al., 2013), ou Leucemia Linfoblástica Aguda (Kreile et al., 2014), em ambas como possível fator de risco aumentado para o desenvolvimento da doença.

A avaliação do risco de desenvolvimento das neoplasias hematológicas associado às variantes polimórficas do gene *MDR1* permitiu-nos verificar que a presença do genótipo CT representa um fator de risco 1,84 vezes aumentado, predispondo os indivíduos portadores deste genótipo para o desenvolvimento de Gamapatias Monoclonais (GM). Obteve-se ainda que o genótipo CT se apresenta como fator de risco, aumentando em 2,27 vezes a probabilidade de desenvolvimento de Mieloma Múltiplo (MM) (IC95% 1,09 – 4,70, $p=0,028$). Por outro lado, a presença do genótipo CC revelou-se um fator protetor para o desenvolvimento da mesma neoplasia hematológica, com um risco associado de 0,41 (IC95% 0,19 – 0,88, $p=0,023$). Os resultados obtidos apresentam um intervalo de confiança reduzido, pelo que podemos inferir que as conclusões daqui retiradas são fidedignas.

Estudos anteriores sustentam a hipótese de indivíduos homozogóticos para o alelo C terem um aumento da expressão considerável da glicoproteína-P, comparativamente aos indivíduos homozigóticos para o alelo T (Ameyaw et al., 2001; Bernal et al., 2003). Acredita-se que a sequência de aminoácidos determine a expressão proteica, o enrolamento da molécula e a sua função. Mutações que modifiquem a estrutura primária da proteína podem alterar estas características (Hoffmeyer et al., 2000; Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

Apesar do polimorfismo C3435T ser considerado uma mutação silenciosa, está descrito que altera os níveis de expressão e de atividade da P-gp, alterando também a especificidade de substrato (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Pôs-se a hipótese de que, quando codões frequentes são alterados para codões menos frequentes, haja modificações nos

tempos de enrolamento proteico e que isso possa alterar a função desempenhada pela proteína (Angov, 2011; Anthony and Skach, 2002; Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

Desta forma, podemos presumir que o polimorfismo rs1045642 é um fator responsável pela alteração de expressão da proteína MDR1 e pela variação da sua função, predispondo os indivíduos portadores do genótipo CT para desenvolver Gamapatias Monoclonais, nomeadamente Mieloma Múltiplo. Esta consequência pode resultar de uma alteração no reconhecimento de substratos pela proteína MDR1, passando a realizar efluxo de substâncias necessárias às células na manutenção do seu bom funcionamento. Por outro lado, a presença de, pelo menos, um alelo T terá um efeito protetor no desenvolvimento de Mieloma Múltiplo para os indivíduos portadores desta característica.

5.2 *Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1)*

A MRP1 é a segunda proteína com mais relevância na superfamília de transportadores ABC, com uma estrutura muito semelhante à da MDR1, diferindo apenas numa região transmembranar terminal adicional. (Gottesman et al., 2002) Tem sido recorrentemente associada a resistência celular induzida em casos oncológicos (Cole et al., 1992) por reconhecer, além dos substratos endógenos do normal funcionamento da célula (conjugados de glutathione no mecanismo de defesa celular anti-oxidativa, p.e.), fármacos utilizados na terapêutica.

Foi já observado que SNP na zona promotora do gene podem afetar a expressão por alterarem a afinidade de ligação de fatores de transcrição, razão pela qual estas alterações genéticas estão associadas com o prognóstico de doença. (Lehnerdt et al., 2009) Por outro lado, estudos prévios revelaram que SNP no gene *MRP1* são fatores de prognóstico da resposta à quimioterapia em múltiplos câncros (Leslie et al., 2003; Obata et al., 2006). Tal como no caso do *MDR1*, alterações genéticas associadas ao *MRP1* podem interferir com os níveis de expressão e de função proteicos, podendo pôr em causa a manutenção do

funcionamento celular normal e, a nível oncológico, o tratamento aplicado. Segundo estudos anteriores (Obata et al., 2006; Zhao et al., 2010), não parece haver alterações na expressão da MRP1 mas a sua função parece estar aumentada em casos de cancro do ovário e hepatocarcinoma celular, razão pela qual se desenvolve resistência aos fármacos administrados.

A avaliação das frequências genótípicas da população europeia originaram frequências de 46,0% relativos ao genótipo AA, 12,4% ao genótipo GG e 41,6% ao genótipo AG. Comparativamente a estes valores, a análise das frequências genótípicas nos controlos não neoplásicos deste estudo não se revelaram concordantes com os obtidos previamente (CTL: AA, 47,9%; GG, 0,7%; AG, 51,4%), de onde podemos retirar que existe uma diminuição considerável na percentagem de GG e um aumento na percentagem do genótipo AG.

O cálculo do risco das variantes do polimorfismo rs4148330 associado ao desenvolvimento das patologias hematológicas em estudo revelou um aumento da propensão de desenvolvimento de Gamapatias Monoclonais em 10,18 vezes (IC95% 1,25 – 82,68; $p=0,030$), e, consistentemente, um aumento de 9,46 vezes da probabilidade de desenvolver GM (IC95% 1,18 – 75,69; $p=0,034$), calculado pelo Modelo Recessivo, associados ao genótipo GG. No caso dos doentes de MM surgiram também resultados relevantes, consistentes com os apresentados previamente, que indicam um aumento de 14,21 vezes na probabilidade de desenvolver a doença, quando o genótipo do indivíduo é GG (IC95% 1,68 – 120,16, $p=0,016$). A presença do genótipo GG revelou-se ainda um fator de risco para o desenvolvimento MM 14,3 vezes superior, quando se calculou o risco através do Modelo Recessivo. Ainda que estes resultados sejam estatisticamente significativos, o intervalo de confiança é demasiado alargado para podermos considerá-los credíveis. De modo a confirmar os resultados obtidos, será necessário alargar o número da amostra a estudar. Da avaliação do OR pudemos observar ainda um efeito protetor para o aparecimento de LMA no caso de o indivíduo ser portador de, pelo menos, um alelo dominante (alelo A), sendo que neste caso é de 0,50 vezes.

De um modo grosseiro, os nossos resultados sugerem que a presença de, no mínimo, um alelo A tem um efeito protetor no desenvolvimento de LMA, e que a presença do alelo G representa um fator de risco para o desenvolvimento de GM, nomeadamente MM, apesar dos intervalos de confiança associados.

Alterações no gene *ABCC1*, nomeadamente na região promotora, podem resultar em alterações no transporte da glutathiona (GSH), um dos principais substratos da MRP1, que desempenha funções antioxidantes importantes na manutenção da integridade celular, incluindo a regulação dos níveis de ácido ascórbico (Pompella et al., 2003). A presença do ácido ascórbico foi já associada aos níveis de ferritina no sangue, estando assim também relacionado com o desenvolvimento de anemia (Malone et al., 1986), uma das características das neoplasias hematológicas.

Estudos anteriores descrevem que células em apoptose, em resposta a diversos estímulos como *stress* oxidativo, libertam GSH para o meio extracelular, possivelmente através de transporte ativo mediado pela MRP1 (Cole and Deeley, 2006). Estas alterações, juntamente com a acumulação de compostos não-conjugados podem culminar numa acumulação de substâncias oxidantes prejudiciais à célula, possivelmente levando-a a uma resposta apoptótica.

Está descrito que em indivíduos com LMA a expressão da MRP1 está substancialmente aumentada, comparativamente com a expressão basal das células hematopoiéticas não-malignas, o que poderá ser explicado por alterações na ativação da transcrição do gene *MRP1* (Burger et al., 1994; Kolk et al., 1999), possivelmente como no caso do polimorfismo por nós estudado (rs4148330).

5.3 *Uridine-Cytidine Kinase 2 (UCK2)*

A UCK2 catalisa a fosforilação dos nucleótidos uridina e citidina em produtos com funções anti-cancerígenas e anti-virais, que participam na síntese dos ácidos nucleicos (Negrão et al., 2014; Sheffield, 1987; Suzuki et al., 2004). Esta proteína pode ainda catalisar a fosforilação de substratos análogos à uridina e à citidina, utilizados como terapêutica no tratamento do cancro, como a 5-azacitidina. A perda de função da UCK2 foi já associada à resistência a análogos nucleosídicos, que deixam de ser metabolizados e, assim, não cumprem o seu objetivo terapêutico (Reichard and Sköld, 1957; Shen et al., 1998). Contudo, estudos anteriores observaram um aumento da concentração proteica de UCK2 em casos de tumor (Van Rompay et al., 2001), o que poderá representar uma tentativa de resposta à diminuição da função metabolizadora normal.

Na análise do risco das variantes do polimorfismo rs2185268 do gene *UCK2*, associado ao desenvolvimento de NH, verificou-se que a presença genótipos portadores do genótipo GG é um fator de risco aumentado em 4,59 vezes para o desenvolvimento de SMD/NMP. Sendo que o polimorfismo rs2185268 ocorre na região intrónica do gene *UCK2*, mais especificamente na zona reguladora do promotor do gene (“www.ensembl.org,” 2015), poderá haver uma alteração na sua expressão, resultando em níveis alterados da proteína UCK2.

Variações polimórficas em zonas reguladoras do gene *UCK2*, ainda que pouco descritas na literatura, poderão alterar os níveis de biossíntese de ácidos nucleicos e de regeneração de bainhas de mielina, podendo resultar em alterações do funcionamento e da integridade celulares.

Alterações genéticas deste tipo foram já identificadas em neoplasias hematológicas como SMD, e revelaram-se importantes na aquisição de resistência e na resposta como a terapêuticas como azacitidina (AZA) ou decitabina (DAC). (Sripayap et al., 2013; Valencia et al., 2014) Em células resistentes aos substratos análogos, está descrita um decréscimo na função proteica das UCK2. (Hasegawa et al., 2002)

Adicionalmente, tendo em consideração que a proteína UCK2 é parte da regeneração de bainhas de mielina, no futuro será pertinente o estudo da influência de polimorfismos em patologias neurodegenerativas.

5.4 Carnitine/Organic Cation Transporter 2 (OCTN2)

A proteína OCTN2 é uma das moléculas responsáveis pelo transporte membranar de influxo (Tamai et al., 1998). Esta molécula transporta carnitina, num mecanismo ativado por iões de sódio (Na^+) e tendo em conta as diferenças de pH, e xenobióticos, mecanismo que não necessita de ativação por iões. (Kwok et al., 2006) A carnitina facilita o metabolismo de ácidos gordos de cadeias longas para produção de energia nas mitocôndrias e a proteína OCTN2 é o seu principal transportador. (Kano et al., 2009; Ohashi et al., 1999)

Estudos prévios relacionaram as variações genéticas do polimorfismo rs274561 com o aumento da predisposição para desenvolvimento de doenças como a doença de Crohn ou tumores do estroma gastrointestinal, com uma maior propensão para adquirir fenótipos associados com deficiência de carnitina, derivados da perda de função da proteína OCTN2. (Angelini et al., 2013; Urban et al., 2006; Xuan et al., 2012)

A molécula transportadora OCTN2 está também associada ao transporte de xenobióticos para o interior das células, razão pela qual poderá existir uma ligação com as alterações de concentrações intracelulares de fármaco, caso o gene que a codifica (*SLC22A5*) esteja alterado, tendo já sido identificado em casos de resistência ao Imatinib. (Angelini et al., 2013)

Neste trabalho, o polimorfismo rs274561 no gene *SLC22A5* não se revelou como parte dos fatores de risco ou de proteção da predisposição para o desenvolvimento de neoplasias hematológicas. Contudo, será relevante estudar a relevância deste polimorfismo em

cardiologia ou na área nutricional, dada a sua relação com os níveis de carnitina e de metabolização de ácidos gordos.

De modo a alcançar uma maior compreensão acerca do papel dos polimorfismos nos mecanismos de influxo de substâncias para o meio intracelular, será também necessário avaliar um maior número de genes relevantes nesta função.

5.5 Risco associado aos perfis genéticos

O desenvolvimento neoplásico é geralmente resultante de uma acumulação gradual de alterações genéticas que vão alterando o normal funcionamento celular, podendo inclusivamente conferir poder metastático às células afetadas (Suzuki et al., 2001; Yokota, 2000). Por esta razão, avaliamos a possibilidade de a conjugação dos polimorfismos rs1045642 (*MDR1*), rs4148330 (*MRP1*), rs2185268 (*UCK2*) e rs274561 (*OCTN2*) ser responsável pelo aumento ou pela diminuição da predisposição de desenvolvimento das neoplasias hematológicas SMD, LMA, SMD/NMP, MM e MGUS.

A análise do risco associado aos perfis genéticos dos polimorfismos rs1045642, rs414833, rs4148330 e rs2185268 englobou um total de 59 perfis distintos, resultantes das combinações possíveis entre os genótipos em estudo. Neste trabalho, os perfis genéticos não revelaram estatisticamente significativos quando avaliados como possíveis fatores de risco de desenvolvimento neoplásico.

Os resultados obtidos podem ser justificados pelo baixo número de amostras disponíveis para avaliação, dificultando a análise da influência de cada perfil genético no desenvolvimento das neoplasias estudadas.

5.6 Análise da influência dos polimorfismos na sobrevivência global

A eficácia da terapêutica aplicada a casos oncológicos pode sofrer alterações, caso haja modificações nos mecanismos de distribuição e/ou de ativação dos fármacos. A resistência adquirida a fármacos é comumente associada a polimorfismos em genes que codificam proteínas transportadoras (Gottesman and Pastan, 1993; Gottesman et al., 2002) e metabolizadoras (Sripayap et al., 2013). Por esta razão, avaliou-se a influência das variantes polimórficas dos genes *MDR1*, *MRP1*, *UCK2* e *OCTN2* na progressão das neoplasias hematológicas.

A análise do efeito dos polimorfismos na resposta terapêutica de indivíduos com neoplasias hematológicas revelou que doentes de Mieloma Múltiplo com o genótipo GG da variante polimórfica do gene *UCK2* apresentam uma sobrevivência global diminuída em 11 meses. Este resultado sugere que o polimorfismo rs2185268 se traduza numa diminuição da expressão da proteína metabolizadora UCK2, possivelmente tendo como consequência uma resposta diminuída à terapêutica aplicada. Desta forma, os fármacos administrados no tratamento de Mieloma Múltiplo não sofrerão a ativação metabólica necessária para que possam ter um efeito anti-tumoral.

Para uma avaliação mais aprofundada do risco relativo associado aos polimorfismos, será necessário aumentar o número de genes a estudar e avaliá-los por grupos funcionais, de modo a estreitar o olhar sobre este assunto.

Será ainda necessário avaliar as consequências funcionais específicas destes polimorfismos, para que se possam inferir corretamente as consequências destes no desenvolvimento das patologias e na resposta ao tratamento. Para este fim, dever-se-ão determinar as eventuais alterações no transporte de substratos, incluindo os fármacos utilizados em terapêutica que são também reconhecidos pelas proteínas transportadoras

e metabolizadoras, e na sua ativação metabólica. A associação das variantes polimórficas à aquisição de resistência pode também ser associada a este estudo.

De modo a determinar eventuais alterações na progressão das neoplasias, será fundamental acompanhar a evolução dos doentes e avaliar a sobrevivência global nestes casos.

Numa fase ideal de medicina personalizada, a avaliação da predisposição genética para o desenvolvimento de tumores poderá representar um método complementar na prevenção de cancros associados à composição genética.

6. Conclusão

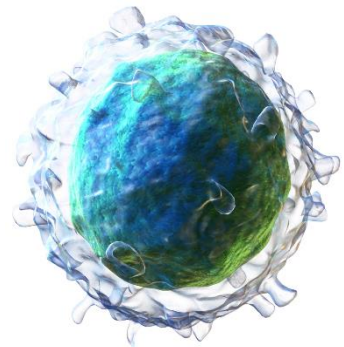


Imagem adaptada de

https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Blausen_gallery_2014#/media/File:Blausen_0624_Lymphocyte_B_cell.png

6. Conclusão

De seguida, apresentam-se as conclusões obtidas a partir da análise de todos os dados obtidos na realização deste estudo, focado no papel dos polimorfismos em proteínas transportadoras e metabolizadoras nas neoplasias hematológicas Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mieloide Aguda, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa, Mieloma Múltiplo e Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado.

✎ As amostras de doentes e de controlos não neoplásicos apresentam-se equilibradas em termos de rácio de indivíduos dos géneros masculino e feminino, não sendo este um fator de parcialidade dos resultados obtidos.

✎ A análise das variantes do polimorfismo rs1045642 relativo ao gene *MDR1* revelou que as frequências alélicas se encontram, de um modo global, enquadradas nos valores observados no estudo populacional europeu. Relativamente à análise das frequências genotípicas, quando comparadas com as frequências da população europeia, os genótipos TT e CC encontram-se em frequências aumentadas em todos os grupos estudados e o genótipo CT apresenta uma frequência diminuída. A análise do *odds ratio* (OR) revelou que o genótipo CT é um fator de risco aumentado para o desenvolvimento de Gamapatias Monoclonais (GM) (OR=1,84; IC95% 1,02 – 3,32, $p=0,043$). Desta análise, podemos ainda concluir que o genótipo CT representa um fator de risco aumentado (OR=2,27; IC95% 1,09 – 4,70, $p=0,028$) e a presença de genótipos portadores do alelo T é um fator protetor (OR=0,41; IC95% 0,19 – 0,88, $p=0,023$) para o desenvolvimento de MM, resultados com significado estatístico associado.

✎ Quando avaliamos o polimorfismo rs4148330 relativo ao gene *MRP1*, verificamos um aumento generalizado nas frequências do alelo A e uma diminuição das frequências do T, quando comparados com o estudo da população europeia. Relativamente às frequências genótípicas, observaram-se diferenças consideráveis nos valores obtidos para o grupo controlo, em comparação com as obtidas no estudo da população europeia. Nos grupos neoplásicos, obtiveram-se frequências concordantes do genótipo AA, frequências aumentadas do genótipo AG e frequências diminuídas do genótipo GG. A análise do risco relativo associado ao polimorfismo permite-nos concluir que o facto de um indivíduo ter genótipo portador do alelo A representa um fator de proteção na probabilidade de desenvolver LMA (OR=0,50; IC95% 0,27 – 0,92, $p=0,027$). Observou-se ainda que indivíduos portadores do genótipo AG têm 0.50x de probabilidade de desenvolver LMA (IC95% 0,27 – 0,94; $p=0,030$). Apesar de existirem tendências aumentadas para o desenvolvimento de GM e MM, as mesmas não apresentam um intervalo de confiança sustentável para aferir conclusões.

✎ O estudo das variantes polimórficas rs2185268 do gene *UCK2* mostrou que os alelos T e G estão presentes nas frequências esperadas, estando em concordância com as obtidas num estudo prévio a um grupo de indivíduos europeus. A análise das frequências genótípicas permite concluir que o genótipo TT se encontra, de uma forma geral, numa frequência diminuída em relação ao que era esperado, e que de uma maneira genérica as frequências dos genótipos GG e GT estão aumentadas. A avaliação do OR permite-nos afirmar que a presença do genótipo GG representa um fator de risco aumentado para o desenvolvimento de SMD/NMP (OR=4,59; IC95% 1,40 – 15,06; $p=0,012$).

✎ No polimorfismo rs274561, relativo ao gene *SLC22A5* que codifica a proteína OCTN2, as frequências dos alelos C e A revelaram-se concordantes com as

observadas num estudo da população europeia realizado previamente. Quando se avaliaram as frequências genotípicas correspondentes, verificou-se uma diminuição da frequência do genótipo CC e aumento na frequência do genótipo AA, ao passo que o genótipo AC não manifestou diferenças relevantes na frequência de aparecimento na população neoplásica, quando comparadas às da população europeia. Quando avaliado o risco relativo associado às variantes polimórficas, não se observaram resultados com significado estatístico.

✂ A avaliação da sobrevivência global dos doentes oncológicos revelou que indivíduos com Mieloma Múltiplo portadores do genótipo GG relativo ao polimorfismo rs2185268 do gene *UCK2* têm uma sobrevivência diminuída em 11 meses, quando comparados aos indivíduos portadores dos genótipos GT ou TT (GG – $31,1 \pm 3,8$ meses; TT ou GT – $42,8 \pm 0,8$ meses; $p=0,017$).

✂ Os resultados obtidos a partir deste trabalho possibilitam-nos afirmar que os polimorfismos são fatores preditivos no desenvolvimento de neoplasias hematológicas e da sua progressão. Numa era de medicina personalizada, poderão ser avaliados como fatores de prognóstico individual.

7. Referências bibliográficas

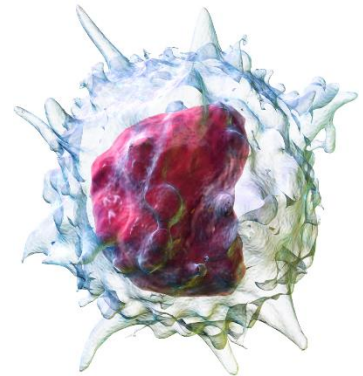


Imagem adaptada de
https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Blausen_gallery_2014#/media/File:Blausen_0649_Monocyte.png

7. Referências bibliográficas

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.
- Allegra, A., Alonci, A., Penna, G., Innao, V., Gerace, D., Rotondo, F., Musolino, C., 2014. The Cancer Stem Cell Hypothesis: A Guide to Potential Molecular Targets. *Cancer Invest.* 32, 470–495. doi:10.3109/07357907.2014.958231
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. a, Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361–98. doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361
- Ameyaw, M.M., Regateiro, F., Li, T., Liu, X., Tariq, M., Mobarek, A., Thornton, N., Folayan, G.O., Githang'a, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D., Price-Evans, D.A., McLeod, H.L., 2001. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 11, 217–221. doi:10.1097/00008571-200104000-00005
- Angelini, S., Pantaleo, M.A., Ravegnini, G., Zenesini, C., Cavrini, G., Nannini, M., Fumagalli, E., Palassini, E., Saponara, M., Di Battista, M., Casali, P.G., Hrelia, P., Cantelli-Forti, G., Biasco, G., 2013. Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacol. Res.* 68, 1–6. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.015
- Angov, E., 2011. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol. J.* 6, 650–659. doi:10.1002/biot.201000332
- Anthony, V., Skach, W.R., 2002. Molecular mechanism of P-glycoprotein assembly into cellular membranes. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3, 485–501. doi:10.2174/1389203023380503
- Arrigoni, O., De Tullio, M.C., 2002. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1569, 1–9. doi:10.1016/S0304-4165(01)00235-5
- Bain, B.J., 1999. The relationship between the myelodysplastic syndromes and the myeloproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma* 34, 443–449.

- Balmain, A., Gray, J., Ponder, B., 2003. The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.* 33 Suppl, 238–244. doi:10.1038/ng1107
- Bartlett, J.M.S., White, A., 2006. Extraction of DNA from Whole Blood, in: Bartlett, J.M.S., Stirling, D. (Eds.), *PCR Protocols*. pp. 29–31.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D. a, Gralnick, H.R., Sultan, C., 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 51, 189–199. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
- Bernal, M., Sinues, B., Fanlo, A., Mayayo, E., 2003. Frequency distribution of C3435T mutation in exon 26 of the MDR1 gene in a Spanish population. *Ther. Drug Monit.* 25.
- Bianchi, G., Munshi, N.C., 2015. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* 125, 3049–3058. doi:10.1182/blood-2014-11-568881.BLOOD
- Boer, J.G. De, Boer, J.G. De, 2001. Mutations and the Genetic Code. *eLS* 1–5.
- Bolli, N., Avet-Loiseau, H., Wedge, D.C., Van Loo, P., Alexandrov, L.B., Martincorena, I., Dawson, K.J., Iorio, F., Nik-Zainal, S., Bignell, G.R., Hinton, J.W., Li, Y., Tubio, J.M.C., McLaren, S., O’ Meara, S., Butler, A.P., Teague, J.W., Mudie, L., Anderson, E., Rashid, N., Tai, Y.-T., Shammash, M. a, Sperling, A.S., Fulciniti, M., Richardson, P.G., Parmigiani, G., Magrangeas, F., Minvielle, S., Moreau, P., Attal, M., Facon, T., Futreal, P.A., Anderson, K.C., Campbell, P.J., Munshi, N.C., 2014. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat. Commun.* 5, 2997. doi:10.1038/ncomms3997
- Brinkmann, U., Eichelbaum, M., 2001. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J.* 1, 59–64. doi:10.1038/sj.tpj.6500001
- Brockmöller, J., 2000. Molecular Genetics of Cancer Susceptibility. *Pharmacology* 212–227. doi:10.1016/S1357-4310(96)80011-6
- Burger, H., Nooter, K., Zaman, G.J., Sonneveld, P., van Wingerden, K.E., Oostrum, R.G., Stoter, G., 1994. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia* 8, 990–997.
- Cavaco, I., Gil, J.P., Gil-Berglund, E., Ribeiro, V., 2003. CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1345–50. doi:10.1515/CCLM.2003.206
- Charlesworth, B., 1990. Mutation-selection balance and the evolutionary advantage of sex and recombination. *Genet. Res.* 55, 199–221. doi:10.1017/S0016672308009658

- Chinnery, P.F., Samuels, D.C., Elson, J., Turnbull, D.M., 2002. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: Is there a common mechanism? *Lancet* 360, 1323–1325. doi:10.1016/S0140-6736(02)11310-9
- Chotinantakul, K., Leraanansaksiri, W., 2012. Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. *Bone Marrow Res.* 2012, 1–16. doi:10.1155/2012/270425
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, a J., Kurz, E.U., Duncan, a M., Deeley, R.G., 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650–1654. doi:10.2307/2882074
- Cole, S.P.C., Deeley, R.G., 2006. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 438–446. doi:10.1016/j.tips.2006.06.008
- Deeley, R.G., Cole, S.P., 1997. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin. Cancer Biol.* 8, 193–204. doi:10.1006/scbi.1997.0070
- Devoret, R., 2004. Mutation. *eLS* 1–8. doi:10.1002/9780470015902.a0022548
- Dispenzieri, A., Katzmman, J. a, Kyle, R. a, Dirk, R., Iii, L.J.M., Colby, C.L., Therneau, T.M., Kumar, S.K., Bradwell, A., Fonseca, R., Rajkumar, S.V., 2010. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* 375, 1721–1728. doi:10.1016/S0140-6736(10)60482-5.Prevalence
- Domen, J., Wagers, A., Weissman, I., 2006. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells, in: *Regenerative Medicine*. pp. 13–34.
- Drain, S., Catherwood, M. a, Orr, N., Galligan, L., Rea, I.M., Hodgkinson, C., Drake, M.B., Kettle, P.J., Morris, T.C.M.C., Alexander, H.D., 2009. ABCB1 (MDR1) rs1045642 is associated with increased overall survival in plasma cell myeloma. *Leuk. Lymphoma* 50, 566–570. doi:10.1080/10428190902853144
- Eisele, L., Dürig, J., Hüttmann, A., Dührsen, U., Assert, R., Bokhof, B., Erbel, R., Mann, K., Jöckel, K.H., Moebus, S., 2012. Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and light-chain MGUS in Germany. *Ann. Hematol.* 91, 243–248. doi:10.1007/s00277-011-1293-1
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47–50. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

- Eyre-Walker, Y.C., Eyre-Walker, A., 2014. The role of mutation rate variation and genetic diversity in the architecture of human disease. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0090166
- Finkel, T., Serrano, M., Blasco, M. a, 2007. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767–774. doi:10.1038/nature05985
- Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J., Norris, M.D., 2010. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* 10, 147–156. doi:10.1038/nrc2789
- Foran, J.M., Shammo, J.M., 2012. Clinical Presentation, Diagnosis, and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *Am. J. Med.* 125, S6–S13. doi:10.1016/j.amjmed.2012.04.015
- Frank, N.Y., Schatton, T., Frank, M.H., 2010. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept 120. doi:10.1172/JCI41004.continuously
- Fryxell, K.J., Moon, W.J., 2005. CpG mutation rates in the human genome are highly dependent on local GC content. *Mol. Biol. Evol.* 22, 650–658. doi:10.1093/molbev/msi043
- Fukuda, Y., Schuetz, J.D., 2012. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1073–83. doi:10.1016/j.bcp.2011.12.042
- Fung, K.L., Gottesman, M.M., 2009. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 860–871. doi:10.1016/j.bbapap.2009.02.014.A
- Gervasini, G., Vizcaino, S., Carrillo, J.A., Caballero, M.J., Benitez, J., 2006. The effect of CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5 and the MDR1 polymorphisms and gender on the urinary excretion of the metabolites of the H-receptor antihistamine ebastine: a pilot study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 62, 177–86. doi:10.1111/j.1365-2125.2006.02578.x
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E., 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58. doi:10.1038/nrc706
- Gottesman, M.M., Pastan, I., 1993. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385–427.
- Graur, D., 2008. Single-base Mutation. *eLS* 1–5. doi:10.1002/9780470015902.a0022548
- Gregersen, H., Mølleknjaer, L., Salling Ibsen, J., Sørensen, H.T., Olsen, J.H., Pedersen, J.O., Dahlerup, J.F., 2000. Cancer risk in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Am. J. Hematol.* 63, 1–6.

- Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, a, Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, a, Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koefler, H.P., Klein, H.-U., Dugas, M., Aburatani, H., Kohlmann, a, Miyano, S., Haferlach, C., Kern, W., Ogawa, S., 2014. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241–7. doi:10.1038/leu.2013.336
- Hansen, M.M.F., Cavenee, W.W.K., 1987. Genetics of Cancer Predisposition. *Cancer Res.* 47, 5518–5527.
- Hasegawa, T., Futagami, M., Kim, H.-S., Matsuda, A., Wataya, Y., 2002. Analysis of single nucleotide polymorphisms in uridine/cytidine kinase gene encoding metabolic enzyme of 3'-ethynylcytidine. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 237–238.
- Hattori, H., Suminoe, A., Wada, M., Koga, Y., Kohno, K., Okamura, J., Hara, T., Matsuzaki, A., 2007. Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 31, 1633–1640. doi:10.1016/j.leukres.2007.04.009
- Heuck, C.J., Mehta, J., Bhagat, T., Yu, Y., Khan, S., Chrysofakis, G., Schinke, C., Tariman, J., Vickrey, E., Nischal, S., Zhou, L., Meagher, R., Hu, C., Suzuki, M., Parekh, S., Reu, F., Steidl, U., Greally, J., Verma, A., Seema, B., 2013. Myeloma Is Characterized by Stage-Specific Alterations in DNA Methylation That Occur Early during Myelomagenesis. *J. Immunol.* 190, 2966–2975. doi:10.4049/jimmunol.1202493
- Hitzl, M., Drescher, S., van der Kuip, H., Schäffeler, E., Fischer, J., Schwab, M., Eichelbaum, M., Fromm, M.F., 2001. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 11, 293–298. doi:10.1097/00008571-200106000-00003
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H.P., Brockmöller, J., John, a, Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., Brinkmann, U., 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3473–8. doi:10.1073/pnas.050585397
- Ieiri, I., Takane, H., Hirota, T., Otsubo, K., Higuchi, S., 2006. Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2, 651–674. doi:10.1517/17425255.2.5.651
- Jr, J.D.S., Zhan, F., Burington, B.E., Huang, Y., Colla, S., Hanamura, I., Stewart, J.P., Kordsmeier, B., Randolph, C., Williams, D.R., Xiao, Y., Xu, H., Epstein, J., Anaissie, E., Krishna, S.G., Cottler-fox, M., Hollmig, K., Mohiuddin, A., Pineda-roman, M., Tricot, G., Rhee, F. Van, Sawyer, J., Alsayed, Y., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie,

- B., 2007. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 109, 2276–2284. doi:10.1182/blood-2006-07-038430.The
- Juliano, R.L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.
- Kanji, S., Pompili, V.J., Das, H., 2011. Plasticity and maintenance of hematopoietic stem cells during development. *Recent Pat. Biotechnol.* 5, 40–53.
- Kano, T., Kato, Y., Ito, K., Ogihara, T., Kubo, Y., Tsuji, A., 2009. Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN2 (Slc22a5) Is Responsible for Renal Secretion of Cephaloridine in Mice. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1009–1016. doi:10.1124/dmd.108.025015
- Kasper, D.L., Hauser, S.L., Jameson, J.L., Fauci, A.S., Longo, D.L., Loscalzo, J., Harrison, T.R., 2015. *Harrison's Principles of Internal Medicine*.
- Keller, G., Kennedy, M., Pappayannopoulou, T., Wiles, M. V, 1992. Hematopoietic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* 13, 473–486.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.-W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S. V, Gottesman, M.M., 2007. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525–8. doi:10.1126/science.1135308
- Kolk, D.M. van der, M.D., E.V., Müller, M., Vries, E.G.E. de, 1999. Multidrug Resistance Protein MRP1, Glutathione, and Related Enzymes, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology, Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III*. pp. 187–198.
- Kreile, M., Rots, D., Piekuse, L., Cebura, E., Kovalova, Z., Lace, B., 2014. Lack of Association between Polymorphisms in Genes MTHFR and MDR1 with Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia 15, 9707–9711.
- Kroeger, K.M., Carville, K.S., Abraham, L.J., 1997. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol. Immunol.* 34, 391–399. doi:S0161589097000527 [pii]
- Kwok, B., Yamauchi, A., Rajesan, R., Chan, L., Dhillon, U., Gao, W., Xu, H., Wang, B., Takahashi, S., Semple, J., Tamai, I., Nezu, J.-I., Tsuji, A., Harper, P., Ito, S., 2006. Carnitine/xenobiotics transporters in the human mammary gland epithelia, MCF12A. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R793–R802. doi:10.1152/ajpregu.00087.2005
- Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F., Li, L.J.M., 2002. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.* 346, 564–569.

- Lehnerdt, G.F., Franz, P., Bankfalvi, a., Grehl, S., Kelava, a., Nüchel, H., Lang, S., Schmid, K.W., Siffert, W., Bachmann, H.S., 2009. The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 20, 1094–1099. doi:10.1093/annonc/mdn763
- Leslie, E.M., Létourneau, I.J., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2003. Functional and structural consequences of cysteine substitutions in the NH2 proximal region of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochemistry* 42, 5214–5224. doi:10.1021/bi027076n
- Levine, E.G., Bloomfield, C.D., 1992. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin. Oncol.* 19, 47–84.
- Ling, H., Vincent, K., Pichler, M., Fodde, R., Berindan-Neagoe, I., Slack, F.J., Calin, G. a, 2015. Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene* 1–9. doi:10.1038/onc.2014.456
- Lodish, H., Berk, a, 2008. *Molecular cell biology. Perspective.*
- Longo, N., Filippo, C.A. di S., Pasquali, M., 2006. Disorders of Carnitine Transport and the Carnitine Cycle. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 142C, 77–85. doi:10.1002/ajmg.c.30087.DISORDERS
- Maffioli, M., Camós, M., Gaya, A., Hernández-Boluda, J.C., Álvarez-Larrán, A., Domingo, A., Granell, M., Guillem, V., Vallansot, R., Costa, D., Bellosillo, B., Colomer, D., Cervantes, F., 2011. Correlation between genetic polymorphisms of the hOCT1 and MDR1 genes and the response to imatinib in patients newly diagnosed with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 35, 1014–1019. doi:10.1016/j.leukres.2010.12.004
- Mailankody, S., Pfeiffer, R.M., Kristinsson, S.Y., Korde, N., Bjorkholm, M., Goldin, L.R., Turesson, I., Landgren, O., 2011. Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes after multiple myeloma and its precursor disease (MGUS). *Blood* 118, 4086–4092. doi:10.1182/blood-2011-05-355743
- Malone, H.E., Kevany, J.P., Scott, J.M., O’Broin, S.D., O’Connor, G., 1986. Ascorbic acid supplementation: its effects on body iron stores and white blood cells. *Ir. J. Med. Sci.* 155, 74–79.
- Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A., Gerner, E.W., 2003. *Molecular Biology of Cancer.*
- McMaster, M.L., Kristinsson, S.Y., Turesson, I., Bjorkholm, M., Landgren, O., 2009. Novel aspects pertaining to the relationship of Waldenstrom macroglobulinemia, IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), polyclonal

- gammopathy and hypoglobulinemia. *Clin. Lymphoma Myeloma* 9, 19–22.
doi:10.3816/CLM.2009.n.003.Novel
- Metzler, K., n.d. Nonsense Mutation: Definition, Example & Quiz [WWW Document]. URL <http://study.com/academy/lesson/nonsense-mutation-definition-example-quiz.html#lesson> (accessed 5.20.15).
- Miners, J.O., Birkett, D.J., 1998. Cytochrome P4502C9: An enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 45, 525–538. doi:10.1046/j.1365-2125.1998.00721.x
- Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., Norris, M., 2007. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* 59, 752–757.
doi:10.1080/15216540701736285
- Nebert, D.W., Russel, D.W., 2002. Clinical Importance of the Cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155–1162.
- Negrão, L., Almeida, P., Alcino, S., Duro, H., Silva, U.M., Figueira, R., Gonçalves, S., 2014. Effect of the combination of uridine nucleotides , folic acid and vitamin B12 on the clinical expression of peripheral neuropathies 4, 191–196.
- Nimer, S.D., 2008. Myelodysplastic syndromes. *Blood* 111, 4841–51. doi:10.1182/blood-2007-08-078139
- Nishizato, Y., Ieiri, I., Suzuki, H., Kimura, M., Kawabata, K., Hirota, T., Takane, H., Irie, S., Kusuhara, H., Urasaki, Y., Urae, A., Higuchi, S., Otsubo, K., Sugiyama, Y., 2003. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 73, 554–565.
doi:10.1016/S0009-9236(03)00060-2
- Obata, H., Yahata, T., Quan, J., Sekine, M., Tanaka, K., 2006. Association between single nucleotide polymorphisms of drug resistance-associated genes and response to chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res.* 26, 2227–2232.
- Odenike, O., Onida, F., Padron, E., 2015. Myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: an update on risk stratification, molecular genetics, and therapeutic approaches including allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *ASCO* 35, 398–41.
- Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J.I., Oku, a, Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, a, 1999. Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 778–784.

- Ota, E., Abe, Y., Oschika, Y., Ogata, T.T., Tamaokii, N., Nakamura, M., 1995. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 550–554.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Loo, P. Van, Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M.J., Forbes, S. a, Raine, K., Hinton, J., Mudie, L.J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., Porta, M.G. Della, Meara, S.O., Ambaglio, I., Galli, A., Butler, A.P., Walldin, G., Teague, J.W., Quek, L., Sternberg, A., Gambacorti-passerini, C., Cross, N.C.P., Green, A.R., Boulwood, J., Vyas, P., Hellstrom-lindberg, E., Bowen, D., Cazzola, M., Stratton, M.R., Campbell, P.J., 2013. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616–3627. doi:10.1182/blood-2013-08-518886.The
- Pettersson, M., Jernberg-Wiklund, H., Larsson, L.-G., Sundström, C., Givol, I., Tsujimoto, Y., Nilsson, K., 1998. Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* 79, 495–503.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499–1503. doi:10.1016/S0006-2952(03)00504-5
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2012. *Farmacologia*, 7^a ed.
- Regateiro, F.J., 2003. *Manual de Genética Médica*, I. ed. Coimbra.
- Reichard, P., Sköld, O., 1957. Formation of Uridine Phosphates from Uracil in Extracts of Ehrlich Ascites Tumor. *Acta Chem. Scand.*
- Roeker, L., Larson, D., Kyle, R., Kumar, S., Dispenzieri, A., Rajkumar, S., 2013. Risk of acute leukemia and myelodysplastic syndromes in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS): a population-based study of 17 315 patients. *Leukemia* 27, 1391–1393. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Sai, Y., Tsuji, A., 2004. Transporter-mediated drug delivery: Recent progress and experimental approaches. *Drug Discov. Today* 9, 712–720. doi:10.1016/S1359-6446(04)03198-8
- Sava, G.P., Speedy, H.E., Houlston, R.S., 2013. Candidate gene association studies and risk of chronic lymphocytic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Leuk. Lymphoma* 95, 1405–1414. doi:10.3324/haematol.2010.022095
- Sekeres, M.A., Keng, M., 2014. Acute Myeloid Leukemia [WWW Document]. URL <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/acute-myelogenous-leukemia/Default.htm> (accessed 5.21.15).

- Sheffield, L.G., 1987. Cyclic cytidine monophosphate stimulates DNA synthesis by bovine mammary tissue in vitro. *Cell Biol. Int. Rep.* 11, 557–562. doi:10.1016/0309-1651(87)90018-X
- Shen, F., Look, K.Y., Yeh, Y.A., Weber, G., 1998. Increased uridine kinase (ATP: uridine 5'-phosphotransferase; EC 2.7.1.48) activity in human and rat tumors. *Cancer Biochem. Biophys.* 16, 1–15.
- Shoji, Y., Koizumi, a, Kayo, T., Ohata, T., Takahashi, T., Harada, K., Takada, G., 1998. Evidence for linkage of human primary systemic carnitine deficiency with D5S436: a novel gene locus on chromosome 5q. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 101–108. doi:10.1086/301911
- Siegel, R., Jemal, A., 2014. *Cancer Facts & Figures.* Am. Cancer Soc.
- Sobrino, B., Brión, M., Carracedo, A., 2005. SNPs in forensic genetics: A review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci. Int.* 154, 181–194. doi:10.1016/j.forsciint.2004.10.020
- Sparreboom, a, van Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, a H., Smit, J.W., Meijer, D.K., Borst, P., Nuijten, W.J., Beijnen, J.H., van Tellingen, O., 1997. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2031–2035. doi:10.1073/pnas.94.5.2031
- Sripayap, P., Nagai, T., Uesawa, M., Kobayashi, H., Tsukahara, T., Ohmine, K., Muroi, K., Ozawa, K., 2013. Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines. *Exp. Hematol.* 42, 294–306.e2. doi:10.1016/j.exphem.2013.12.004
- Stewart, B.W., Wild, C.P., 2014. *World Cancer Report 2014*, World Health Organization: Geneva. doi:9283204298
- Suzuki, M., Ohwada, M., Saga, Y., Saito, S., Sato, I., 2001. Are DNA mismatch repair deficiencies responsible for accumulation of genetic alterations in epithelial ovarian cancers? *Cancer Genet. Cytogenet.* 124, 152–158. doi:10.1016/S0165-4608(00)00346-0
- Suzuki, N.N., Koizumi, K., Fukushima, M., Matsuda, A., Inagaki, F., 2004. Structural basis for the specificity, catalysis, and regulation of human uridine-cytidine kinase. *Structure* 12, 751–764. doi:10.1016/j.str.2004.02.038
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W., 2008. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue.

- Szotkowski, T., Rohon, T., Zapetalova, J., Sicova, K., Hubacek, J., Indrak, K., 2009. Secondary acute myeloid leukemia – a single center experience. *Neoplasma* 56, 317–320. doi:10.4149/neo
- Taheri, M., Mahjoubi, F., Omranipour, R., 2010. Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients. *Genet. Mol. Res.* 9, 34–40. doi:10.4238/vol9-1gmr669
- Talmadge, J.E., Fidler, I.J., 2010. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1040
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J.I., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., Tsujit, A., 1998. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* 273, 20378–20382. doi:10.1074/jbc.273.32.20378
- Tefferi, A., Vardiman, J.W., 2009. Myelodysplastic Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 361, 1872–1885.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7735–7738. doi:10.1073/pnas.84.21.7735
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., Pastan, I., 1987. Expression of a full-length cDNA for the human “MDR1” gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 3004–3008. doi:10.1073/pnas.84.9.3004
- Urban, T.J., Gallagher, R.C., Brown, C., Castro, R. a, Lagpacan, L.L., Brett, C.M., Taylor, T.R., Carlson, E.J., Ferrin, T.E., Burchard, E.G., Packman, S., Giacomini, K.M., 2006. Functional genetic diversity in the high-affinity carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Mol. Pharmacol.* 70, 1602–1611. doi:mol.106.028126 [pii]\r10.1124/mol.106.028126
- Valencia, a, Masala, E., Rossi, a, Martino, a, Sanna, a, Buchi, F., Canzian, F., Cilloni, D., Gaidano, V., Voso, M.T., Kosmider, O., Fontenay, M., Gozzini, a, Bosi, a, Santini, V., 2014. Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacitidine. *Leukemia* 28, 621–8. doi:10.1038/leu.2013.330
- Van de Donk, N.W.C.J., Palumbo, A., Johnsen, H.E., Engelhardt, M., Gay, F., Gregersen, H., Hajek, R., Kleber, M., Ludwig, H., Morgan, G., Musto, P., Plesner, T., Sezer, O., Terpos, E., Waage, A., Zweegman, S., Einsele, H., Sonneveld, P., Lokhorst, H.M., 2014. The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined

- significance and related disorders: Recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica* 99, 984–996. doi:10.3324/haematol.2013.100552
- Van Rompay, a R., Norda, a, Lindén, K., Johansson, M., Karlsson, a, 2001. Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Mol. Pharmacol.* 59, 1181–1186. doi:10.1124/mol.59.5.1181
- Van Rompay, A., Johansson, M., Karlsson, A., 1999. Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: molecular characterization of the human enzyme, in: *Molecular Pharmacology*. pp. 562–569.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol. GSE* 34, 275–305. doi:10.1051/gse
- Voisey, J., Morris, C.P., 2008. SNP technologies for drug discovery: a current review. *Curr. Drug Discov. Technol.* 5, 230–235. doi:10.2174/157016308785739811
- Wang, L., Shen, W., Xu, L., Chen, M.-B., Gong, T., Lu, P.-H., Tao, G.-Q., 2012. The association between polymorphisms in the leptin receptor gene and risk of breast cancer: a systematic review and pooled analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 136, 231–239. doi:10.1007/s10549-012-2228-9
- Wang, Z., Wang, B., Tang, K., Lee, E.J.D., Chong, S.S., Lee, C.G.L., 2005. A functional polymorphism within the MRP1 gene locus identified through its genomic signature of positive selection. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2075–2087. doi:10.1093/hmg/ddi212
- Widmer, N., Rumpold, H., Untergasser, G., Fayet, a, Buclin, T., Decosterd, L. a, 2007. Resistance reversal by RNAi silencing of MDR1 in CML cells associated with increase in imatinib intracellular levels. *Leukemia* 21, 1561–2; author reply 1562–4. doi:10.1038/sj.leu.2404671
- Wright, A., Charlesworth, B., Rudan, I., Carothers, A., Campbell, H., 2003. A polygenic basis for late-onset disease. *Trends Genet.* 19, 97–106. doi:10.1016/S0168-9525(02)00033-1
- Wright, A.F., 2005. Genetic variation: polymorphisms and mutations. *eLS* 1–10. doi:10.1038/npg.els.0005005
- Wu, C., Hsieh, C., Wu, Y., 2011. The Emergence of Drug Transporter-Mediated Multidrug Resistance to Cancer Chemotherapy 1996–2011.
- Wu, X., Prasad, P.D., Leibach, F.H., Ganapathy, V., 1998. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 589–595. doi:10.1006/bbrc.1998.8669

- www.astrazeneca.com.br, 2014. Oncologia - Astrazeneca [WWW Document]. URL <http://www.astrazeneca.com.br/2011/oncologia-mama-tratamento.asp> (accessed 5.2.15).
- www.ensembl.org [WWW Document], 2015. URL http://may2015.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;g=ENSG00000143179;r=1:165827531-165911618;v=rs2185268;vdb=variation;vf=1470251
- www.who.com [WWW Document], 2015. . Cancer. URL <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer> (accessed 5.26.15).
- Xuan, C., Zhang, B.B., Yang, T., Deng, K.F., Li, M., Tian, R.J., 2012. Association between OCTN1/2 gene polymorphisms (1672C-T, 207G-C) and susceptibility of Crohn's disease: A meta-analysis. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 11–19. doi:10.1007/s00384-011-1265-x
- Yokota, J., 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497–503. doi:10.1093/carcin/21.3.497
- You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.-C., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G.R., Dvorak, J., Anderson, O.D., 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics* 9, 253. doi:10.1186/1471-2105-9-253
- Zhao, J., Yu, B.Y., Wang, D.Y., Yang, J.E., 2010. Promoter polymorphism of MRP1 associated with reduced survival in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 16, 6104–6110. doi:10.3748/wjg.v16.i48.6104